

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin Nicole Westerfeld
aus Bocholt

Tag der mündlichen Prüfung:
29.01.2002

**Herstellung rekombinanter *Vaccinia*-Viren als Träger des
Oberflächenproteins MSP1 aus *Plasmodium falciparum* und ihre
Charakterisierung in Hinsicht auf einen Malaria-Impfstoff**

Gutachter: Prof. Dr. Hermann Bujard
Prof. Dr. Christine Clayton

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaac Newton

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg in der Zeit von Januar 1998 bis November 2001 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Hermann Bujard angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hermann Bujard für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit, unter sehr guten Arbeitsbedingungen an diesem interessanten Thema zu arbeiten.

Prof. Dr. Christine Clayton danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Großer Dank geht ebenso an Dr. Gerd Sutter und seine Arbeitsgruppe an der GSF in München für die Kollaboration und die Möglichkeit das Arbeiten mit *Vaccinia*-Viren „vor Ort“ zu lernen.

Ich möchte mich zudem ganz ausdrücklich bei Ulrike Gärtner und Sibylle Ways bedanken für ihre Zuverlässigkeit, ihre Flexibilität und dafür, dass sie sich um alles gekümmert haben, was mit Mäusen zu tun hatte.

Im weiteren danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für viele wissenschaftliche Anregungen und Diskussionen, aber ganz besonders für eine außergewöhnlich angenehme Arbeitsatmosphäre, wie man sie wahrlich nicht überall findet. Darüber hinaus möchte ich mich sehr bei Stefan „C.“ Jäkel, Andrea Kühberger und allen anderen nicht genannten Freuden bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, sie haben mir das Studium erst ermöglicht und mir immer tatkräftig zur Seite gestanden.

Und ich danke Stefan Dürselen für viel Unterstützung und schöne Stunden.

1. EINLEITUNG	1
1.1 Der Lebenszyklus der Malaria-Parasiten	2
1.2 Die Pathogenese der <i>P. falciparum</i>-Infektion	3
1.3 Die Immunantwort auf eine Malaria-Infektion und die Konsequenzen für die Vakzinentwicklung	4
1.4 Impfstoffentwicklung gegen Malaria	7
1.4.1 Impfstoffe gegen prä-erythrozytäre Stadien	9
1.4.2 Impfstoffe gegen die sexuellen Stadien des Erregers	10
1.4.3 Impfstoffe gegen die asexuellen Blutstadien	10
1.5 MSP1 als Impfstoff-Kandidat gegen <i>P. falciparum</i>-Malaria	11
1.5.1 Die Struktur von MSP1	11
1.5.2 MSP1 als potentieller Impfstoff	13
1.6 Vaccinia-Virus als Impfstoff-Träger für MSP1	14
1.7 Ziele dieser Arbeit	16
2. ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN	18
2.1 Abkürzungen	18
2.2 Definitionen	20
3. MATERIAL	21
3.1 Laborausstattung	21
3.2 Verbrauchsmaterial	22
3.3 Chemikalien	22
3.4 Radioisotope	23
3.5 Enzyme	23
3.6 Seren und Antikörperkonjugate	23
3.7 Primer	24
3.8 Plasmide	24
3.9 Biologische Materialien	24
3.10 Material für die Kultur von <i>E. coli</i>	25
3.11 Material für die Kultur von eukaryotischen Zellen	25
3.12 Puffer, Medien und Stammlösungen	25
3.12.1 Material für molekularbiologische Standardtechniken	25
4. METHODEN	33
4.1 DNA-Transfer in <i>E. coli</i> Zellen	33
4.1.1 Herstellung von <i>E. coli</i> Zellen für die Elektroporation	33
4.1.2 Elektroporation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	33

4.1.3	Herstellung kompetenter E. coli Zellen für die CaCl ₂ -Methode (optimiertes Protokoll nach Inoue et al., 1990).....	33
4.1.4	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli Zellen nach der CaCl ₂ -Methode.....	33
4.1.5	Schnellmethode zur Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli Zellen.....	34
4.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli	34
4.2.1	Schnellmethode zur Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus E. coli Zellen ("Mini-Prep").....	34
4.2.2	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli Zellen über Anionenaustauscher-Chromatografie ("Maxi-Prep").....	34
4.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren	35
4.3.1	Extraktion von Proteinen aus DNA-Lösungen	35
4.3.2	Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen.....	35
4.3.3	Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen.....	36
4.3.4	Elektroelution in "Hochsalz"	36
4.3.5	Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen (Silica-Adsorption)	36
4.3.6	Aufreinigung synthetisierter Oligonukleotide ("primer")	37
4.3.7	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	37
4.4	Analyse von Plasmid-DNA	37
4.4.1	Restriktionsanalyse.....	37
4.4.2	Analyse der DNA mittels Gel-Elektrophorese	38
4.4.3	Enzymatische DNA-Sequenzierung nach Sanger	38
5.3.2	Analyse bakterieller Kolonien durch α -Komplementation.....	40
4.5	In vitro Modifikation und Rekombination von DNA	40
4.5.1	Dephosphorylierung der 5' Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase.....	40
4.5.2	Phosphorylierung von 5'-hydroxylierten Enden durch Polynukleotidkinase	40
4.5.3	Auffüllen von 5'-überhängenden, bzw. Entfernen von 3'-überhängenden, einzelsträngigen DNA-Enden durch T4 DNA-Polymerase.....	40
4.5.4	Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	41
4.5.5	Enzymatische in vitro Amplifikation von DNA mittels Taq-Polymerase (PCR) Saiki et al., 1988)	41
4.5.6	Ortsspezifischer Nukleotidaustausch ("Site-directed Mutagenesis")	41
4.6	Analyse von rekombinanten Proteinen	42
4.6.1	Expression der MSP-1 Fragmente in E. coli	42
4.6.2	Analyse von Proteinen durch diskontinuierliche, denaturierende PAA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
4.6.3	Färbung von Proteinen in PAA-Gelen mit Coomassie-Blau	43
4.6.4	Silberfärbung von PAA-Gelen nach Heukeshoeven	43
4.6.5	"Immunoblot" zur Identifikation rekombinanter Proteine	43
4.6.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford (Bradford, 1976).....	44
4.7	In vitro Kultur von MVA (modifiziertes Vaccinia Virus Ankara)	44
4.7.1	Wachstum von MVA.....	44
4.8	Expression rekombinanter Proteine durch MVA	45
4.8.1	Transiente Expression.....	45
4.8.2	Expression durch rekombinanten MVA	46
4.8.3	Analyse rekombinanter MVA	47
4.9	Nachweis von in vivo synthetisierten Proteinen in MVA-infizierten Zellen.....	47

4.9.1	„Immunoblot“-Analyse MVA-infizierter Zellen	47
4.9.2	Immunperoxidase-Färbung.....	48
4.9.3	Indirekte Immunfluoreszenz (IFA)	48
4.9.4	Nichtradioaktive “Northernblot” Analyse (Low, 1998).....	48
4.10	Aufreinigung der in MVA infizierten Zellen synthetisierten Proteine.....	51
4.10.1	Aufreinigung rekombinanter MSP-1 Fragmente mittels Immunaффinitätschromatographie.....	51
4.11	Immunisierungsstudien im Mausmodell	51
4.11.1	Immunisierung mit rekombinanten MVA	52
4.11.2	Immunisierung mit gereinigtem, rekombinantem Protein	52
4.12	Immunologische Methoden zur Analyse der Seren	52
4.12.1	“Immunoblot“-Analyse Plasmodium-infizierter Erythrozyten	52
4.12.2	IFA mit Plasmodium-infizierten Erythrozyten.....	53
4.12.3	“Enzyme linked immunosorbent Assay” (ELISA).....	53
4.12.4	Invasionsinhibierung durch MVA-spezifische neutralisierende Antikörper.....	54
5.	ERGEBNISSE	55
5.1	Konstruktion des <i>msp1d</i> Gens	55
5.1.1	Konstruktion des <i>msp1d</i> Gens aus einzelnen Fragmenten.....	55
5.2	Konstruktion von MSP1 Expressionsvektoren	58
5.2.1	Modifikation der C- und N-terminalen Bereiche von MSP1	58
5.2.2	Vektoren zur Expression von MSP1 in Prokaryoten.....	59
5.3	Herstellung rekombinanter MVA zur Expression von <i>msp1</i>	65
5.3.1	Herstellung von Vektoren zur Integration von <i>msp1</i> Sequenzen in das MVA-Genom.....	66
5.3.2	Transiente Expression von <i>msp1</i> in MVA-infizierten Zellen	69
5.3.3	Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren (MVA)	71
5.3.4	Analyse rekombinanter MVA	74
5.3.5	Aufreinigung von MSP1D-42 aus dem Medium rMVA- <i>msp1d/42S</i> -infizierter HeLa-Zellen	83
5.4	Immunisierung von Mäusen mit MSP1D-42 und mit rekombinanten MVA-Stämmen ..	85
5.4.1.	Humorale Immunantwort nach der Immunisierung mit rMVA- <i>msp1d/42S</i> und rMVA- <i>msp1d/42A</i>	85
5.4.2	Humorale Immunantwort nach der Immunisierung mit rekombinantem MSP1D-HX42 aus <i>E. coli</i>	88
5.4.3	Humorale Immunantwort nach der Immunisierung mit rMVA- <i>msp1d/42S</i> bzw. rMVA- <i>msp1d/42A</i> in Kombination mit rekombinantem MSP1D-HX42 aus <i>E. coli</i>	89
5.4.4	Humorale Immunantwort gegen Wildtyp-MVA	91
5.4.5	Analyse der MSP1D-spezifischen Antikörper im Serum immunisierter Mäuse.....	92
6.	DISKUSSION	94
6.1	MSP1 aus <i>P. falciparum</i>: Voraussetzungen für eine Analyse seiner Funktion und seinen Einsatz als Impfstoff	94
6.1.1	Perspektiven, die sich durch die Expression der synthetischen <i>msp1</i> -Gene eröffnen	95
6.2	MSP1D kann in Prokaryoten hergestellt werden	98
6.2.1	Der Versuch, MSP1 in „L-Form“-Bakterien herzustellen	98
6.2.2	Die Synthese der C-terminalen MSP1D-Fragmente in Prokaryoten führt zu unterschiedlichen Konformationen der Proteine.....	99

6.3	MVA als Trägerorganismus für MSP1	99
6.3.1	Herstellung und Charakterisierung rekombinanter MVA, die msp1d exprimieren	101
6.3.2	Charakterisierung von MSP1D-42 und MSP1D-38/42 aus rMVA-infizierten Zellen.....	103
6.4	Rekombinante MVA als Impfstoff gegen Malaria.....	105
6.4.1	Die Induktion einer MSP1D-42-spezifischen Immunantwort durch msp1d-42-rekombinante MVA und MSP1D-HX42 aus E. coli	106
6.4.2	Ausblicke zur Entwicklung eines Impfstoffs gegen Malaria aus Basis von MSP1 und MVA ...	111
7.	ZUSAMMENFASSUNG.....	114
8.	LITERATUR.....	115
9.	ANHANG.....	132

1. EINLEITUNG

Der Name „Malaria“ ist aus dem italienischen „mala aria“ entstanden und stammt noch aus der Zeit, in der „schlechte Luft“ als Verursacher vieler Krankheiten galten.

Die erste schriftliche Erwähnung dürfte die „Fiebererkrankung bei Homer (800 v. Chr.) sein, und eine erstaunlich präzise Beschreibung stammt von dem griechischen Gelehrten und Arzt Hippokrates (um 400 v.Chr.). Im Jahre 1888 schließlich erklärte der Medizinische Almanach die Malaria zu der Infektionskrankheit, der die meisten Menschenleben zum Opfer fielen.

Vor mehr als hundert Jahren entdeckte Alphonse Laveran, dass die Krankheit durch einen Protozoen im Blut verursacht wird und identifizierte somit den Erreger (Laveran, 1880). Siebzehn Jahre später konnte Sir Donald Ross zeigen, dass Stechmücken der Gattung *Anopheles* verantwortlich sind für die Übertragung von Mensch zu Mensch (Ross, 1897).

Auch heute noch zählt Malaria zu den gefährlichsten Infektionskrankheiten. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zu Folge werden jährlich 400 bis 900 Millionen Krankheitsepisoden registriert. Nach neuesten Informationen der Multilateralen Initiative gegen Malaria (MIM) sterben zwischen 700.000 und 2,7 Millionen Menschen, insbesondere Kinder unter fünf Jahren (75%) und schwangere Frauen, jedes Jahr an der Infektion (MIM, 2001). Dabei treten ca. 90% der Todesfälle in Afrika auf.

Verursacht wird die Krankheit durch einzellige Protozoen der Gattung *Plasmodium* aus dem Phylum *Apicomplexa*. Es gibt vier Arten, die den Menschen infizieren: *Plasmodium malariae*, verantwortlich für Malaria quartana, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*, beide verursachen Malaria tertiana und schließlich *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica und letztlich verantwortlich für fast alle tödlichen Infektionen.

Die Entdeckung von DDT als Insektenbekämpfungsmittel und die Trockenlegung von Sümpfen eröffneten die Möglichkeit, den Überträger zu bekämpfen, und die billige Produktion von Chloroquin und Quinin ermöglichte den breiten Einsatz gegen den Erreger selbst. Dies veranlasste die WHO 1955 ein Programm zur weltweiten Ausrottung der Malaria ins Leben zu rufen. Doch letztlich war dies nur in Südeuropa und Nordamerika, die zu Beginn des letzten Jahrhunderts noch von Malaria betroffen waren, von dauerhaftem Erfolg. In den Gebieten, die am stärksten von Malaria betroffen waren, d.h. Afrika, Lateinamerika und Asien, konnte die Krankheit nur kurzzeitig eingedämmt werden und brach in Folge zudem in Gebieten aus, die vorher als malariafrei galten. Verantwortlich für diesen Rückschlag waren das Entstehen von insektizidresistenten Moskitos und chloroquinresistenten Parasiten aber auch die schlechte Infrastruktur und damit mangelnde Versorgung der Bevölkerung in den armen Regionen der Welt. Dies führte neben weiteren Gründen 1972 zur Einstellung des Ausrottungsprogramms durch die WHO.

Neben dem Einsatz von Pharmaka gegen den Parasiten werden heutzutage weitere Strategien verfolgt, wie z.B. die Verwendung von Insektizid-imprägnierten Bettnetzen. Fortschritte in der Molekular- und Zellbiologie ermöglichen tiefere Einblicke in die Biologie der Parasiten, die Pathogenese der Krankheit, sowie die Immunantwort bei der Infektion. Die Möglichkeit, Parasitengene zu klonieren, die Genprodukte zu identifizieren und mittels reverser Genetik

ihre Funktion *in vivo* zu untersuchen, haben unsere Kenntnisse erheblich erweitert. Programme der WHO wie das „Roll Back Malaria“ beinhalten neben der Weiterentwicklung der Gesundheitssysteme in betroffenen Ländern, die Suche nach neuen Insektiziden und im besonderen die Entwicklung neuer Medikamente zur Bekämpfung der Erkrankung. Große Bedeutung hat in diesem Zusammenhang die Forschung an Impfstoffen gegen Malaria. Die Entwicklung genetisch veränderter Moskitos, die ihrerseits resistent sind gegen die Parasiten, wird ebenfalls verfolgt.

Das Malaria Genomprojekt wird sehr schnell weitere wichtige Informationen liefern. Man kann davon ausgehen, dass hierdurch neue Ziele für Interventionen mit Medikamenten, Impfstoffen und Insektiziden erkennbar werden.

1.1 Der Lebenszyklus der Malaria-Parasiten

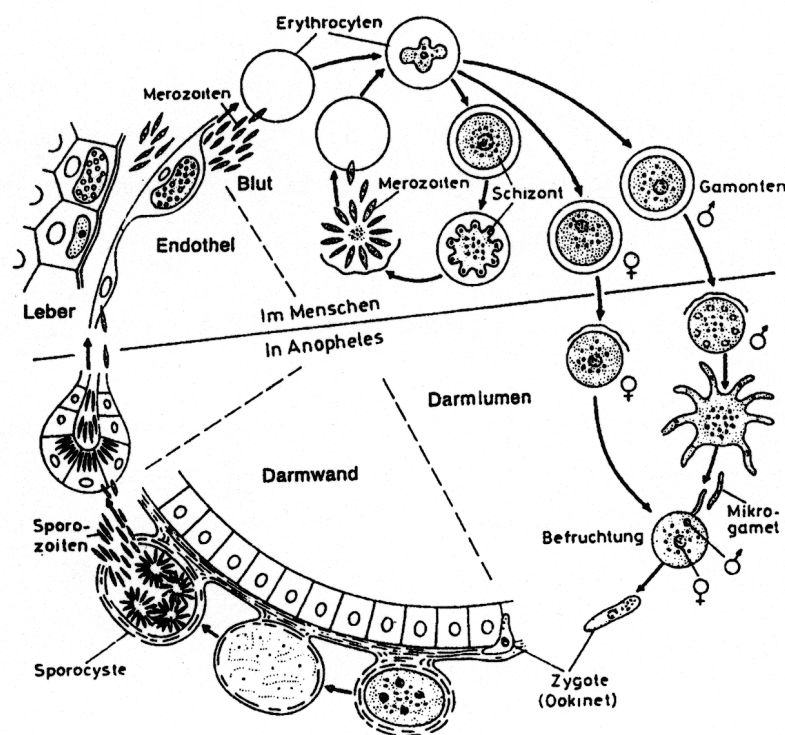


Abb. 1.1: Der Lebenszyklus von *P. falciparum*

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung des Lebenszyklus des Malaria-Erregers *P. falciparum*. Die obere Hälfte zeigt die Entwicklung des Parasiten im Menschen mit seinen unterschiedlichen Stadien, im unteren Teil sind die Stadien im Mosquito dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung findet sich im nachfolgenden Text.

Der Lebenszyklus der Malaria-Erreger ist in Abbildung 1.1 exemplarische für *P. falciparum* dargestellt. Malaria-Parasiten werden durch 60 der 380 bekannten *Anopheles* Arten verbreitet. Sticht eine mit *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* oder *P. malariae* infizierte, weibliche *Anopheles*-Mücke einen Menschen, so gelangen Sporozoiten des Malaria-Erregers aus der Speicheldrüse des Moskitos in die menschliche Blutbahn. Einmal im Körper, verbringen die

Sporozoiten weniger als 30 min im Blut, bevor sie die Leber erreichen und Hepatozyten infizieren. Dort vollzieht sich der Übergang vom Moskito zum menschlichen Wirt, und es entwickeln sich in den nächsten 2 – 10 Tagen (für *P. falciparum* 5 – 6 Tage) aus einem Sporozoiten über mehrere asexuelle Teilungen 10.000 bis 30.000 Merozoiten. Auf der Stufe der Leberstadien unterscheiden sich die Lebenszyklen von *P. vivax* und *P. ovale* vom *P. falciparum*-Lebenszyklus: *P. vivax* und *P. ovale* entwickeln zusätzlich eine persistierende Form des Leberstadiums, die als chronische Infektion in Erscheinung tritt. Dieses Stadium wird als „sekundäre exo-erythrozytäre Schizogonie“ bezeichnet und tritt bei *P. falciparum* nicht auf. Nachdem die Entwicklung in den Hepatozyten abgeschlossen ist, gelangen die Merozoiten in die Blutbahn und infizieren Erythrozyten. Der sogenannte „erythrozytäre Zyklus“ beginnt. Die intrazellulären Merozoiten entwickeln sich zunächst in das Ringstadium und anschließend in die Trophozitenstadien, was mit dem starken Wachstum der Parasiten einher geht. Während des folgenden Schizonten-Stadiums teilen sich die Parasiten (Schizogonie) und es entstehen 8 – 32 neue Merozoiten, die durch die Lyse des Erythrozyten freigesetzt werden und umgehend neue Erythrozyten infizieren. Durch inflammatorische Substanzen, die mit der Lyse der roten Blutkörperchen freigesetzt werden, entstehen die für Malaria typischen Fieberschübe. Bei *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* ist die intraerythrozytäre Entwicklung aller Merozoiten synchronisiert und dauert genau 48 h (*P. vivax* und *P. ovale*) bzw. 72 h (*P. malariae*). Sie ist verantwortlich für die, in Intervallen von 48 h bzw. 72 h auftretenden Fieberattacken. *P. falciparum* benötigt 42 – 48 h für einen erythrozytären Zyklus, hier findet die Entwicklung nicht synchron statt. Einige Merozoiten entwickeln sich in den Erythrozyten nicht zu neuen Merozoiten, sondern differenzieren zu sexuellen Formen, den Gamonten. Diese Formen können sich im Menschen selbst nicht weiter entwickeln. Werden sie aber bei der nächsten Blutmahlzeit von einem weiblichen Moskito aufgenommen, entwickeln sie sich im Darm der Mücke zu Mikro- und Makrogameten und verschmelzen zu diploiden Ookineten (Zygoten), die sich durch die Darmwand bohren, abrunden und auf der Aussenseite des Darms zu Oozysten heranwachsen. In den Oozysten bilden sich unreife Sporozoiten, die nach drei Wochen zu den Speicheldrüsen der *Anopheles*-Mücke wandern, dort zu reifen Sporozoiten differenzieren und bei der nächsten Blutmahlzeit erneut in den menschlichen Wirt gelangen.

1.2 Die Pathogenese der *P. falciparum*-Infektion

Es ist das erythrozytäre Stadium, das für die Pathogenese der *P. falciparum*-Infektion verantwortlich ist, die Infektion mit Sporozoiten an sich und die Entwicklung der Parasiten in den Hepatozyten bleibt meist asymptomatisch. Generell läßt sich die Pathogenese der Malaria-Infektion auf drei Aspekte zurückführen: (i) das exponentielle Wachstum des Parasiten und die Ruptur der Erythrozyten, (ii) die begleitende Immunantwort und (iii) die Modifikation der Erythrozytenoberfläche durch *P. falciparum*.

Die Lyse der Erythrozyten führt einerseits zu einer Anämie, wichtiger aber ist die gleichzeitige Freisetzung von großen Mengen an pyrogenen und inflammatorischen Substanzen. Diese „Malaria-Toxine“ stimulieren die Zellen des Immunsystems zur Sekretion

von Zytokinen darunter der durch Makrophagen und T-Zellen sekretierte Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin 1 (IL-1). Die Überproduktion an TNF- α bewirkt zum einen verschiedene immun-pathologische Erscheinungen, spielt aber zusätzlich eine Rolle bei der Inhibition der Hämatopoese im Knochenmark und der Erythrophagozytose. Das wiederum verstärkt neben der direkten Zerstörung der Erythrozyten durch die Parasiten die Anämie (Good et al., 1998; Jakobsen et al., 1993). TNF- α scheint zudem die sogenannte zerebrale Malaria zu beeinflussen. Eine Studie an afrikanischen Kindern belegt, dass die zirkulierenden TNF- α -Menge im Blut mit dem Auftreten von zerebraler Malaria korreliert (Clark et al., 1991). Diese Form der Krankheit entsteht durch Sequestrierung der Erythrozyten. Während der Infektion modifiziert *P. falciparum* die Oberfläche der roten Blutzellen mit sogenannten „Neoantigenen“, z.B. PfEMP1. Diese Proteine sind verantwortlich für eine Adhäsion der infizierten Erythrozyten an Endothelzellen der Kapillaren, wodurch die Parasiten der Elimination durch die Milz entgehen (Howard and Gilladoga, 1989). Aber das Sequestrieren führt zusammen mit der Rosettenbildung – dem Verklumpen von infizierten mit nicht infizierten Erythrozyten - auch zur Verstopfung dieser feinen Gefäße und damit zur Unterversorgung der betroffenen Organe. Damit einher gehen Entzündungen, schwere neurologische Symptome sowie Multiorganversagen, die unbehandelt Koma und Tod zur Folge haben können. Zahlreiche Moleküle vermitteln die Bindung der infizierten Erythrozyten zu den Endothelzellen. Einige davon sind identifiziert, darunter CD36 (Oquendo et al., 1989), intrazelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) (Berendt et al., 1989), vasikuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1), E-Selektin (Ockenhouse et al., 1992) und Chondroitin-Sulfat A (Rogerson et al., 1995).

Die Unterversorgung des Gehirns kann auch nach überstandener Malaria zu bleibenden neurologischen Schäden führen. So ist Malaria in Afrika die Hauptursache für neurologische Defekte.

1.3 Die Immunantwort auf eine Malaria-Infektion und die Konsequenzen für die Vakzinentwicklung

Besonders gefährdet durch die Infektion mit *P. falciparum* sind Kinder unter fünf Jahren, da sie keinen Schutz mehr durch mütterliche Antikörper besitzen und noch keinen eigenen Schutz vor der Krankheit entwickelt haben (Marsh, 1993). Im weiteren sind Schwangere, darunter in erster Linie Erstgebärende, besonders betroffen. Einerseits bedingt durch die Zytoadhäsion infizierter Erythrozyten an das Plazenta-Endothel, im weiteren durch die mit der Schwangerschaft einher gehenden Immunsuppression (Wegmann et al., 1993). Anfangs schien es, als habe die Infektion mit HIV und die damit verbundene Schwächung des Immunsystems keinen oder einen nur geringen Einfluß auf den Krankheitsverlauf von Malaria (Chandramohan and Greenwood, 1998), mittlerweile wurde jedoch ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Malaria-Symptome und einer bestehenden HIV-Infektion beobachtet (French et al., 2001).

Bei vielen Infektionskrankheiten, wie z.B. Masern und Pocken, reicht ein einmaliger Kontakt des Immunsystems des Wirts mit dem Erreger oder Virus aus, um eine lebenslange Immunität

gegen eine erneute Infektion hervorzurufen. Diese Form der sogenannten sterilen Immunität gibt es im Fall der Malaria nicht. Selbst nach mehreren Jahren mit wiederholten Infektionen entsteht im Idealfall nur eine klinische Sterilität, d.h. eine milde, asymptomatische Form der Malaria, gekennzeichnet durch eine niedrigere Parasitämie. Die Immunität gegen Malaria ist zudem kurzlebig und ein regelmäßiger Kontakt mit dem Parasiten daher Voraussetzung für ihr Bestehen und der Grund, warum diese Immunität lediglich bei der Bevölkerung in endemischen Gebieten beobachtet wird (Hoffman et al., 1987; Taylor-Robinson, 2000).

Obwohl keine sterile Immunität beobachtet wird, gibt es dennoch deutliche Hinweise, dass die Entwicklung eines Malaria-Impfstoffes möglich ist:

(i) In Tieren kann durch Immunisierung ein Schutz gegen Malaria bewirkt werden. So waren Affen, die mit in Freund`schem Kompletten Adjuvans emulgierten Merozoiten von *Plasmodium knowlesi* immunisiert wurden, gegen eine spätere Infektion durch denselben Parasiten-Stamm geschützt (Mitchell et al., 1977).

(ii) Die auftretende Parasitämie bei einer Infektion nimmt mit dem Alter ab, und die Symptome werden milder (Field und Niven, 1937). Dies wird durch eine zunehmende Immunität nach häufigen Infektionen erklärt.

(iii) Der passive Transfer von Immunglobulinen aus dem Blut von geschützten Erwachsenen auf erkrankte Kinder führt zu einer dramatischen Abnahme der Parasitämie bei den Kindern (Cohen et al., 1961).

(iv) Die Immunisierung von Menschen mit bestrahlten Sporozoiten führt zu einer sterilen Immunität gegen Malaria (Clyde et al., 1973; Clyde et al., 1975).

Ein Grund für den Unterschied in der Immunität gegen diese Krankheit verglichen mit vielen anderen Infektionserkrankungen liegt in der Komplexität des Lebenszyklus der Plasmodien. Während seiner Entwicklung durchläuft der Parasit in Anpassung an den jeweiligen Wirt sehr unterschiedliche Stadien, in denen verschiedene Antigene exprimiert werden. Die Immunmechanismen gegen die einzelnen Stadien sind in Abbildung 1.2 dargestellt.

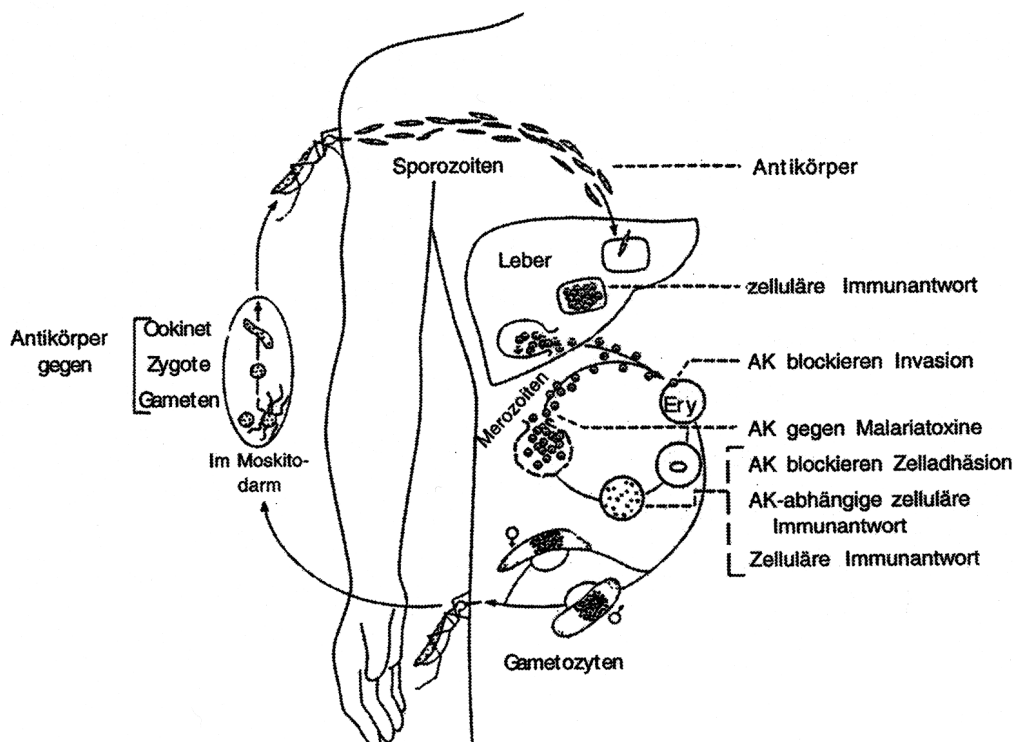


Abb. 1.2: Immunantwort gegen die unterschiedlichen Stadien des Plasmodium-Lebenszyklus (modifiziert nach Good et al., 1998)

Der Lebenszyklus der *Plasmodium ssp.* kann in drei Bereiche unterteilt werden, bei denen unterschiedliche Immunmechanismen zum Tragen kommen: das prä-erythrozytäre Stadium mit Sporozoiten und Leberstadien, dem der Schutz in erster Linie auf zellulärer Ebene zugeschrieben wird, das asexuelle Blutstadium mit intraerythrozytären Stadien und Merozoiten und als drittem die sexuellen Blutstadien und die Stadien, welche sich im Moskitodarm entwickeln. In diesen Stadien wird eine effektive Immunantwort vorrangig über Antikörper vermittelt. Eine detaillierte Beschreibung der jeweiligen Mechanismen erfolgt im Text.

Generell lassen sie sich drei Ebenen unterscheiden, auf denen die Immunantwort wirksam wird: (i) das prä-erythrozytäre Stadium, (ii) das asexuelle Blutstadium und (iii) die Gametozyten, durch die der Parasit übertragen wird.

Gelangen Sporozoiten in den Körper, so können Antikörper, die gegen Oberflächenproteine dieses Stadiums gerichtet sind, die Parasiten neutralisieren und damit die Infektion der Leber verhindern. Allerdings sind die Sporozoiten auf Grund ihrer geringen Verweildauer im Blut nur sehr kurze Zeit für neutralisierende Antikörper zugänglich. Das bedeutet, dass die Antikörper zum einen sehr effektiv an die Sporozoiten binden und zudem in sehr hohen Titern vorhanden sein müssen. Man geht mittlerweile davon aus, dass neben der humoralen in erster Linie die zelluläre Immunantwort gegen das Parasitenstadium in den Hepatozyten eine wichtige Rolle im Schutz gegen die Infektion spielt. Experimente in der Maus konnten zeigen, dass *Plasmodium*-Proteine in den infizierten Leberzellen zu Peptiden prozessiert und in MHC-Klasse-I-Komplexen auf der Oberfläche präsentiert werden (Weiss et al., 1988). Eine Reihe von Befunden zeigen, dass auch im Menschen eine gegen die infizierten Leberzellen gerichtete, zelluläre Immunantwort ausgelöst wird (Zur Übersicht: Hoffman, 1996) Der

Schutz auf der Stufe der Leberstadien ist in erster Linie auf die Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ) und weitere Zytokine durch CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zurückzuführen (zur Übersicht: Plebanski and Hill, 2000).

Die Immunantwort gegen die asexuellen Blutstadien erfolgt über andere Mechanismen: CD8⁺-T-Zellen haben keinen direkten Einfluss auf die Infektion von Erythrozyten durch Merozoiten, da diese Blutzellen weder die Maschinerie zur Präsentation von Antigenen auf MHC-Molekülen, noch MHC-Moleküle selbst, besitzen. Anders als beim Leberstadium beschränkt sich der schützende Teil der Immunantwort in diesem Stadium in erster Linie auf den humoralen Zweig. Sehr deutlich gezeigt wurde dies in dem klassischen Experiment durch Cohen et al., in dem der passive Transfer von Gamma-Immunglobulinen von immunen Erwachsenen auf akut erkrankte Kinder die Parasitämie der Kinder drastisch senkte und diese sich von der Krankheit erholten (Cohen et al., 1961).

Mehrere Ziele können durch Antikörper erkannt werden: Zum einen Antigene auf der Merozoiten-Oberfläche, Ihre Bindung durch Antikörper kann beispielsweise die Invasion der Erythrozyten durch die Parasiten verhindern. Im weiteren werden *Plasmodium*-spezifische Antigene auf der Oberfläche der infizierten Zelle - z.B. für die Zytoadhäsion und Rosettenbildung verantwortliche Proteine - gebunden und die infizierten Blutzellen dadurch eliminiert (zur Übersicht siehe: Good et al., 1998; Berzin and Perlmann, 1996).

Die Induktion einer schützenden Immunantwort im Menschen ist neben der humoralen Antwort maßgeblich von CD4⁺-T-Zellen abhängig (Rzepczyk et al., 1989). Zusätzlich zeigten *in vitro* Experimente, dass γ/δ -T-Zellen das Wachstum von *P. falciparum* inhibieren (Elloso et al., 1994). Die Rolle von der CD8⁺-T-Zellen ist nicht im Detail verstanden, aber es ist bekannt, dass auch diese Zellen das Wachstum der Parasiten *in vitro* hemmen (Fell et al., 1994).

Die sexuellen Stadien der Malaria-Erreger sind ebenfalls das Ziel einer Immunantwort. So verhindern Antikörper gegen die Oberflächenproteine der Mikro- und Makrogameten die Transmission durch den Vektor *Anopheles*. Primär hat dies keinen Vorteil für den infizierten Menschen. Langfristig verhindert es aber die Verbreitung der Infektion und schützt somit die Population an Stelle des Individuums.

1.4 Impfstoffentwicklung gegen Malaria

Der wichtigste Schritt bei der Impfstoffentwicklung ist die Identifikation eines geeigneten Antigens. Die Suche nach geeigneten Kandidaten ist jedoch mit zahlreichen Schwierigkeiten verbunden.

(i) Das Fehlen eines guten Tiermodells stellt die größte Hürde dar. Die Übertragbarkeit von Daten aus Experimenten mit Nager-Malaria in Mäusen auf den Menschen ist nur sehr bedingt gegeben. So invadieren die Merozoiten von *P. berghei* und *P. yoelii* vorwiegend Retikulozyten an Stelle von Erythrozyten, wie im Fall von *P. falciparum* (Shear, 1993).

Murine Erythrozyten besitzen zudem MHC-Klasse-I-Moleküle, was sie zu einem potenziellen Ziel einer zytotoxischen Immunantwort macht.

Neben Schimpansen lassen sich nur *Saimiri*- und *Aotus*-Affen mit *P. falciparum* infizieren. Erstere sind aus ethischen Gründen kaum einsetzbar, *Saimiri*-Affen müssen, um infiziert zu werden, vorher splenektomiert werden, was das Modell insgesamt fragwürdig macht. Somit stellen *Aotus*-Affen, jedoch nur *Aotus lemurinus griseimembra* mit dem Karyotyp II und III, das beste, verfügbare Tiermodell bezüglich einer Infektion mit *P. falciparum* dar. Allerdings stehen auch diese Affen unter Artenschutz und können darüber hinaus erst nach einer längeren Adaptationszeit der Parasiten an den Wirt reproduzierbar, und in der Virulenz kontrollierbar infiziert werden. Immunisierungs-Experimente an Freiwilligen bleiben daher das letztlich beste Modell, aber auch hier trifft man auf Schwierigkeiten: Soll beispielsweise ein Impfstoff gegen die erythrozytären Stadien getestet werden, dann ist das Auftreten dieser Parasiten-Stadien in der Blutbahn unvermeidlich. Da zerebrale Malaria jedoch schon bei niedrigen Parasitenkonzentrationen im Blut auftreten und zu schweren Schäden führen kann, müssen solche Experimente bereits bei einer Parasitämie von 0,05% abgebrochen werden. Impfstoffe, deren Schutz erst später greift, lassen sich daher nicht auf diese Weise überprüfen. Die einzige Möglichkeit, diese Vakzin-Kandidaten im Menschen auf ihren Schutz hin zu untersuchen, sind breit angelegte Feldstudien in endemischen Gebieten.

(ii) Im weiteren gibt es keine *in vitro*-Testsysteme zur Identifikation und Erprobung von Impfstoffkandidaten, deren Ergebnisse mit *in vivo*-Daten korrelieren.

Antikörper gegen Sporozoitien und Merozoiten können zwar *in vitro* unter großem technischen Aufwand auf ihr Inhibitionspotential in Bezug auf die Invasion der Parasiten in Hepatozyten und Erythrozyten untersucht werden, die Ergebnisse lassen sich jedoch nur schwer mit *in vivo* Daten korrelieren. Ähnliches gilt für T-Zell-Proliferations-Experimente. Antigene, welche die T-Zellen in Seren von semi-immunen Personen stimulieren, führten auch zur Proliferation von T-Zellen aus Personen, die nie mit *Plasmodium ssp.* Kontakt hatten (Zevering et al., 1992).

(iii) Eine weitere Hürde in der Malaria-Vakzin-Entwicklung ist das Fehlen geeigneter Adjuvantien oder Trägersysteme. Für eine Vielzahl der Experimente an Tieren wurde Freund'sches Adjuvans eingesetzt. Dies ist auf Grund seiner umfangreichen Nebenwirkungen für den Einsatz im Menschen nicht geeignet. Aber auch bei Verwendung alternativer Adjuvantien lassen sich die Ergebnisse mit identischen Trägersubstanzen an unterschiedlichen Tiermodellen oft nicht vergleichen, daher ist eine Übertragung auf den Menschen auch hier nicht gegeben.

(iv) Zusätzlich erschwert *Plasmodium* selbst die Entwicklung eines Impfstoffes. So besitzen die Parasiten die Fähigkeit, ihre Antigene zu verändern. Einige Proteine weisen allele Variationen auf, die normalerweise in Bezug auf das Immunsystem keine Kreuzreaktivität besitzen. Zusätzlich kann *P. falciparum* Proteine, die auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten exprimiert werden (z.B. PfEMP1), austauschen (Craig and Scherf, 2001). Diese werden in Folge dessen nicht mehr durch die Antikörper im Serum erkannt, und die infizierten Blutzellen werden nicht eliminiert.

1.4.1 Impfstoffe gegen prä-erythrozytäre Stadien

Die Tatsache, dass die Infektion mit bestrahlten Sporozoiten sterile Immunität vermittelt, richtete das Augenmerk auf das prä-erythrozytäre Stadium. Die Immunisierung mit bestrahlten Parasiten selbst ist im großen Maßstab jedoch nicht durchführbar. Daher konzentrierte man sich auf die Suche nach einzelnen Antigenen, die einen vergleichbaren Schutz vermitteln. Das am besten untersuchte Antigen ist das Circumsporozoiten-Protein (CSP), das Hauptoberflächen-Protein der Sporozoiten. Neben zahlreichen Versuchen an Tieren wurden auch einige Studien an Menschen durchgeführt (zur Übersicht: Hoffman et al., 1996). Rekombinante Präparationen in Aluminiumhydroxid als Adjuvans erwiesen sich in diesem Zusammenhang jedoch als wenig immunogen (Ballou et al., 1987; Herrington et al., 1987). Erst die Fusion von rekombinantem CSP an das S-Antigen des *Hepatitis-B-Virus* in Kombination mit neuen Adjuvantien (Monophosphoryl lipid A, QS21 und SBAS4), die sogenannte RTS,S-Vakzine, verstärkte die Immunogenität und vermittelte Schutz in sechs von sieben Freiwilligen (Stoute et al., 1997). Wurde auch hier Aluminiumhydroxid als Adjuvans verwendet, so traten weder hohe Antikörpertiter auf, noch waren die Versuchspersonen gegen eine Infektion mit Sporozoiten geschützt. Dabei scheint ein hoher Antikörpertiter zwar notwendig, jedoch nicht ausreichend für einen Schutz zu sein (Hoffman, 1996).

Mit dem Leberstadium als Ziel konzentrierte man sich bei Versuchen am Menschen auf die Induktion einer CD8⁺-T-Zell-vermittelten Immunität. In klinischen Studien mit einem rekombinanten *Vaccinia*-Virus, das sieben verschiedene Antigene (NYVAC-Pf7), darunter CSP und zwei weitere leberspezifische Antigene (LSA1, SSP2) trägt, löste das Virus jedoch nur eine milde zytotoxische Reaktion aus und vermittelte sehr geringen Schutz (Ockenhouse et al., 1998). Ein weiterer Ansatz, um eine CD8⁺-T-Zell-vermittelte Immunreaktion zu induzieren ist der Einsatz von DNA-Vakzinen (zur Übersicht: Doolan and Hoffman, 2001). Die ersten Immunisierungsexperimente mit einer für CSP-kodierenden DNA im Menschen zeigten die Induktion einer antigenspezifischen, cytotoxischen T-Zell-Antwort (Wang et al., 1998).

Neben CSP werden weitere Antigene als Impfstoff-Kandidaten untersucht: zum Beispiel das schon erwähnte Sporozoiten Oberflächenprotein 2 (SSP2 oder TRAP für Thrombospondin-ähnliches Protein) (Khusmith et al., 1994) und die Leberstadien-Antigene 1 und 3 (LSA1 und 3) (Hollingdale et al., 1990; Daubersies et al., 2000).

Wichtig ist, dass eine rein gegen das Leberstadium der *Plasmodium ssp.* gerichtete Immunantwort 100% der Parasiten abtöten muss, da aus nur einem Sporozoiten bis zu 30.000 Merozoiten hervorgehen, die sich im Blut ungehindert vermehren können.

1.4.2 Impfstoffe gegen die sexuellen Stadien des Erregers

Wie schon angesprochen, schützt ein Impfstoff gegen die sexuellen Stadien nicht die immunisierte Person, sondern dient der Population, indem er die Ausbreitung der Parasiten durch den Moskito-Vektor verhindert. Diese Form eines Impfstoffes erlangt besondere Bedeutung als Teil eines Multikomponenten-Impfstoffes, mit dem gegen mehrere Stadien von *Plasmodium* immunisiert wird. Sollte es durch den entstehenden Selektionsdruck zum Auftreten von Plasmodium-Varianten kommen, die resistent gegen Teile der Immunantwort sind, dann verhindert ein solcher Transmissions-blockierender Impfstoff die Ausbreitung dieser Varianten. Da ein Teil dieser Antigene normalerweise nicht in Kontakt mit dem Immunsystem des Wirts kommt, stehen sie unter keinem natürlichen Selektionsdruck, was ihren hohen Konservierungsgrad erklärt.

Untersucht wurden Oberflächenantigene, die während der Entwicklung von Gameten zum Ookinet exprimiert werden. Acht Antigene wurden aus verschiedenen *Plasmodium ssp.* isoliert. Allerdings wurde bis dato nur ein Protein – Pfs25 - rekombinant hergestellt und verhinderte die Übertragung von Parasiten durch *Anopheles*-Mücken im Tiermodell (Kaslow, 1997).

1.4.3 Impfstoffe gegen die asexuellen Blutstadien

Eine Reihe von Merozoiten-spezifischen Antigenen aus *Plasmodium falciparum* wird auf ihr Immunisierungspotential hin untersucht, einen Überblick über die wichtigsten Proteine bietet Tabelle 1.

Generell lassen sie sich in zwei Gruppen einteilen: (i) Antigene auf der Oberfläche der infizierten Blutzelle, die sogenannten „Neoantigenen“ und (ii) Antigene, die mit dem Parasiten selbst assoziiert sind.

Eine Immunantwort gegen „Neoantigene“ auf der Erythrozyten-Oberflächen könnte die Adhäsion an Endothelzellen oder die Rosettenbildung verhindern, zusätzlich zur Eliminierung der infizierten Zellen durch die Milz beitragen und dadurch auch Schutz gegen zerebrale Malaria vermitteln. Untersuchte Proteine sind PfEMP1, Pf332 und Rosettin. Allerdings besitzt *P. falciparum* die Fähigkeit, dem Immunsystem durch Variation einiger dieser Antigene – z. B. PfEMP1 – zu entgehen.

Betrachtet man die Antigene, die mit der Oberfläche der Merozoiten assoziiert sind, so haben sich zwei Proteine als vielversprechende Impfstoffkandidaten herauskristallisiert: das Apikale Merozoiten-Antigen 1 (AMA-1) und das Merozoiten-Oberflächen-Protein 1 (MSP1).

AMA-1 ist in den Rhoptrien lokalisiert und gelangt nach der Freisetzung an die Oberfläche der Parasiten. Die Funktion des Proteins ist noch unbekannt, aber man nimmt an, dass es an der Invasion der Erythrozyten beteiligt ist. Sowohl gereinigtes, natives wie auch rekombinantes AMA-1 vermittelt in Mäusen und Affen Schutz vor Malaria (Deans et al., 1988; Collins et al., 1994). Dabei korreliert der Schutz mit den AMA-1-spezifischen Antikörpertitern, wie auch durch den passiven Transfer von anti-AMA-1-Seren aus Kaninchen auf Mäuse gezeigt werden konnte (Crewther et al., 1996).

Das am besten untersuchte Blutstadien-Antigen ist MSP1. Seine Bedeutung in Bezug auf einen Malaria-Impfstoff wird im nächsten Kapitel näher erläutert.

Auch „Exoantigene“, die während der Ruptur der Erythrozyten freigesetzt werden, bieten Angriffspunkte einer schützenden Immunantwort. Untersucht wurden bisher das Histidinreiche Protein 2 (HRP-2), Pf155/RESA und das Glutamin-reiche Protein (GLURP), das in der parasitophoren Vakuole lokalisiert ist. Immunisierung mit diesen Proteinen ist jedoch nur sinnvoll, wenn mit ihrer Freisetzung eine Funktion einher geht.

Antigen	MW(kDa)	Lokalisation	Funktion	Referenz
PfEMP1	250-300	RBC Oberfläche	Zytoadhärenz	Baruch et al., 1995; Su et al., 1993
Pf332	750	RBC Oberfläche	NB	Mattei et al., 1992
Rosettin	22	RBC Oberfläche	Rosetting	Helmby et al., 1993; Carlson et al., 1994
MSP1	185-220	Mer. Oberfläche	NB	Holder et al., 1985
MSP2	45	Mer. Oberfläche	NB	Smythe et al., 1991
MSP3		Mer. Oberfläche	NB	Oeuvray et al., 1994
SERP	113 o. 126	PV	Proteinase	Delplace et al., 1987; Knapp et al., 1989 Borre et al., 1991
GLURP	220	PV	NB	Berzins et al., 1991; Foley et al., 1991;
RESA/Pf155	155	DG, RBC Skelett	NB	Ruangjirachuporn et al., 1992 Peterson et al., 1989
AMA-1	80	Rhoprien	NB	Sim et al., 1990
EBA-175		Mirkoneme	Ery-bindung	Howard, 1988
HRP-2	65-85	sekretorisch	NB	

Tabelle 1: Impfstoff-Kandidaten der asexuellen *P. falciparum* Blutstadien

Diese Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Abkürzungen: PfEMP-1: „*P. falciparum* erythrocyte membrane Protein 1“; Pf332: „*P. falciparum* Antigen 332“; MSP1 und 2: „merozoite surface protein 1 und 2“; SERP: „serin rich protein“; GLURP: „Glutamate rich protein“; RESA: „ring-infected erythrocyte surface antigene“; AMA-1: „apical merozoite antigene 1“; HRP-2: „histidine rich protein 2“.

NB: nicht bekannt; RBC: „red blood cell“ (Erythrozyt); PV: parasitophore Vakuole; Mer.: Merozoit; DG: Dichte Granula; MW: Molekulargewicht.

1.5 MSP1 als Impfstoff-Kandidat gegen *P. falciparum*-Malaria

1.5.1 Die Struktur von MSP1

MSP1 ist das Hauptoberflächenprotein der *Plasmodium*-Merozoiten und ist auch bekannt als MSA-1 („merozoite surface antigen 1“), PMMSA („precursor to the major merozoite surface antigen) oder als gp190 bzw. gp195, entsprechend den Schätzungen des Molekulargewichts. Homologe Proteine wurden in allen bekannten *Plasmodium ssp.* gefunden. Bis heute sind die kodierenden Sequenzen aus verschiedenen *P. falciparum*-Isolaten bekannt (Chang et al., 1988; Holder et al., 1985; Mackay et al., 1985; Myler, 1989; Peterson et al., 1988; Tanabe et al., 1987; Weber et al., 1986). Auch aus anderen *Plasmodium ssp.* wurde MSP1 isoliert: *P.*

vivax (del Portillo et al., 1989; Gibson et al., 1992), *P. yoelii* (Lewis, 1989), *P. chabaudi* (Deleersnijder et al., 1990; McKean et al., 1993) und *P. berghei* (Jennings et al., 1998).

MSP1 ist ein oligomorphes Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 185 und 200 kDa, je nach Spezies. Sequenzvergleiche verschiedener *P. falciparum*-Laborstämme veranlassten Tanabe 1987 dazu, basierend auf den Homologie-Graden, eine Struktur aus 17 Blöcken für MSP1 vorzuschlagen. Sie unterteilt das Protein in Bereiche hoher, mittlerer und niedriger Konservierung (Abb. 1.3) (Tanabe et al., 1987).

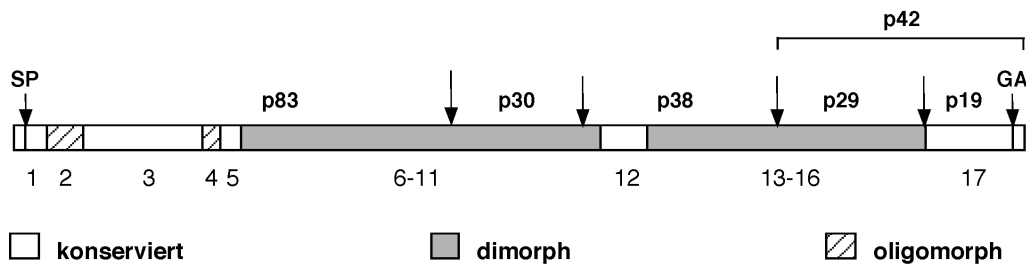


Abb. 1.3: Struktur von MSP1 aus *P. falciparum* nach Tanabe (Tanabe et al., 1987)

p82, p30, p38 und p42 bezeichnen die primären Prozessierungsprodukte von MSP1 aus *P. falciparum*. Die C-terminalen Fragmente p29 und p19 sind die Produkte des sekundären Prozessierungsschritts. Die Prozessierungsstellen sind durch Pfeile markiert. Die Nummer 1 bis 17 bezeichnen verschiedene Blöcke, die sich auf Grund ihrer Homologiegrade unterscheiden. SP kennzeichnet das Signalpeptid und GA den GPI-Anker, der das Protein auf der Oberfläche des Parasiten verankert.

Die Struktur von MSP1 wird aufgrund der Existenz von zwei unterschiedlichen Genvarianten, die nach zwei repräsentativen Isolaten K1 und MAD20 benannt wurden, als dimorph bezeichnet. Block 1 ist ein konservierter Bereich und enthält die 19 Aminosäuren lange, hydrophobe Signalsequenz, die nach Translokation in das Endoplasmatische Retikulum proteolytisch abgespalten wird. Block 2 kann als oligomorph bezeichnet werden. Während die Prototypen MAD20 und K1 in diesem Bereich repetitive Sequenzen aufweisen, ist die Aminosäuresequenz der Isolate RO33 und CSL nicht repetitiv (Certa et al., 1987; Peterson et al., 1988). Auch Block 4 existiert in drei Sequenz-Varianten, während Block 3 stark konserviert ist. Die Blöcke 5 – 16 zeigen sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene den beschriebenen Dimorphismus. Block 17 ist der am stärksten konservierte Bereich. Er enthält 12 Cysteine, die durch Disulphid-Brücken zwei EGF-ähnliche Strukturen ausbilden (Blackman et al., 1991). Zusätzlich trägt er die Information, die zur Verankerung des Proteins durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) auf der Oberfläche der Merozoiten führt.

Exprimiert wird *m脾1* erstmals im Leberstadium bei der Differenzierung der Merozoiten. Später findet die Synthese während der Entwicklung in den Erythrozyten im späten Trophozoiten und im Schizonten statt. Entgegen früherer Befunde (Dieckmann-Schuppert et al., 1994) wird das Protein abgesehen vom GPI-Anker nicht glykosyliert (Berthe et al., 2000). MSP1 wird als Vorläufer-Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 190 kDa synthetisiert (Holder and Freeman, 1982). Auf freien Merozoiten findet man das Protein jedoch als nicht-kovalenten Komplex aus Fragmenten der Größen 83 kDa, 30 kDa, 38 kDa und 42kDa, wobei

das letztgenannte Fragment den Komplex über den GPI-Anker in der Plasmamembran verankert. Diese Fragmente resultieren aus dem primären Prozessierungsprozess zum Ende der Schizogonie (Cooper, 1993). An der Merozoiten-Oberfläche findet eine zweite Prozessierung statt, bei der das C-terminale Fragment von 42 kDa (= p42) zu p29 und p19 gespalten wird. Während der Invasion des Merozoiten in den Erythrozyten wird p29 zusammen mit den anderen N-terminalen Fragmenten abgestreift und einzig p19 verbleibt über den GPI-Anker auf der Oberfläche und kann kurz nach der Invasion innerhalb der Blutzelle nachgewiesen werden (Blackman et al., 1990). Der für die Prozessierungen verantwortliche Mechanismus ist, ebenso wie mögliche Proteasen, noch unbekannt (Cooper and Bujard, 1992). Es wurde spekuliert, dass eine Subtilisin-ähnliche Protease für den zweiten Prozessierungsschritt verantwortlich sei, dies konnte letztlich jedoch nicht bewiesen werden (Blackman et al., 1998). Die sekundäre Prozessierung an sich ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Invasion. Antikörper, die diesen Prozess unterbinden, verhindern gleichzeitig die Infektion der Blutzelle (Blackman et al., 1994).

Über die Funktion von MSP1 gibt es nach wie vor keine eindeutigen Daten. Seine Lokalisation auf der Oberfläche der Merozoiten, ebenso wie die Inhibition der Erythrozyten-Invasion durch MSP1-bindende Antikörper, legen nahe, dass dieses Protein an der Erkennung, Bindung und/oder der Invasion von Erythrozyten beteiligt ist.

1.5.2 MSP1 als potentieller Impfstoff

1981 wurde MSP1 aus *P. yoelii* mittels eines monoklonalen Antikörpers isoliert. Die nachfolgende Immunisierung von Mäusen mit diesem Protein schützte die Tiere vor der andernfalls tödlichen Infektion (Holder and Freeman, 1981). Auch der Transfer von monoklonalen Antikörpern vermittelte Schutz im Mausmodell (Majarian et al., 1984).

Neben Studien an Mäusen wurden auch *Saimiri* und *Aotus*-Affen mit nativem, immunaffinitätsgereinigtem MSP1 immunisiert. In diesen Versuchen schützte das aus *P. falciparum* gewonnene Protein partiell gegen die folgende Infektion mit dem Parasiten (Perrin et al., 1984; Siddiqui et al., 1987).

Eine Aufreinigung von nativem Material aus *Plasmodien* ist allerdings aufwendig und lässt keine Produktion im großen Maßstab zu. Daher konzentriert sich die Impfstoff-Forschung auf die Entwicklung rekombinanter Vakzine.

Die Expression von MSP1 in seiner vollen Länge war bis vor kurzen jedoch nicht möglich, aus diesem Grund befassten sich viele Arbeitsgruppen mit Teilen des Proteins, insbesondere dem konservierten, C-terminalen Bereich, da einige Antikörper, die MSP1-42 erkennen, die Erythrozyteninvasion verhindern. So wurden Mäuse erfolgreich mit aus *E. coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* gereinigtem MSP1-19 immunisiert (Daly and Long, 1993; Ling et al., 1994; Tian et al., 1996; Hirunpetcharat et al., 1997), ebenso wie MSP1-19 tragendes *Mycobacterium bovis* (Matsumoto et al., 1999). Bei diesen Experimenten zeigte sich zudem eine Korrelation zwischen den detektierten Antikörpertitern und dem Schutz vor Malaria. Auch rekombinante MSP1-19-exprimierende *Salmonella typhimurium* wurden zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt, was die Tiere jedoch nicht schützte (Somner et al.,

1999). Alternativ zur Immunisierung mit nativen oder rekombinanten Proteinen wurde auch für *msp1-19*-kodierende DNA als Impfstoff eingesetzt und schützte immunisierte Mäuse vor der Infektion mit *P. chabaudi* (Wunderlich et al., 2000).

Immunisierungen von Affen mit rekombinantem MSP1 lieferten weniger einheitliches Ergebnisse (Etlinger and Altenburger, 1991; Herrera et al., 1990; Herrera et al., 1992). Teilweise vermittelte die Immunisierung mit rekombinantem MSP1-19 und MSP1-42 Schutz (Kumar et al., 1995; Eder et al., 2000; Chang et al., 1996; Stowers et al., 2001), während andere Versuche mit rekombinant hergestellten, C-terminalen Fragmenten die Erkrankung der Affen nicht verhindern konnte (Burghaus et al., 1996; Kumar et al., 1995). Die Interpretation von Immunisierungsversuchen an Affen ist allerdings nur bedingt möglich, da eine statistische Auswertung der Ergebnisse auf Grund der geringen Versuchstierzahlen nicht gegeben ist.

In Phase I und II Studien zu MSP1-Fragmenten als Impfstoff wurde deren Immunogenität auch im Menschen gezeigt. Dabei handelte es sich um p19, fusioniert an eine T-Helfer-Zell-Epitope des Tetanustoxins (Keitel et al., 1999) und die MSP1-Blöcke 3 und 4 (Saul et al., 1999; Genton et al., 2000).

Einige epidemiologische Studien in endemischen Gebieten zeigten eine Korrelation zwischen Antikörpertitern gegen MSP1 und der Immunität gegen Malaria (Tolle et al., 1993; Riley et al., 1992; Riley et al., 1993), allerdings trifft dies lediglich auf Erwachsene zu. Die humorale Immunantwort bei Kinder läßt keinen derartigen Zusammenhang erkennen. Hier ist die humorale Antwort zudem kurzlebiger als bei Erwachsenen (Früh et al., 1991).

Diese Untersuchungen zusammen mit den Immunisierungsstudien an Tieren belegen, dass es sich bei MSP1 um einen vielversprechenden Kandidaten zur Entwicklung eines Malaria-Impfstoffs handelt.

1.6 *Vaccinia*-Virus als Impfstoff-Träger für MSP1

Vaccinia Viren gehören zusammen mit den *Variola*-, Kuh-Pocken und anderen zur Gattung *Orthopoxvirus* in der Unterfamilie der *Chordopoxvirinae*. Es handelt sich bei den Pocken-Viren um eine große Familie von komplexen Viren, die mit einem doppelsträngigen DNA-Genom von ca. 200 kb und einer Größe von 250 x 350 nm zu den größten bekannten Viren gehören. Sie bestehen aus einem quaderförmigen Virion, dass von einer Membranhülle umgeben ist. In der Wirtszelle verläuft die Replikation und Generation der Pocken-Viren ausschließlich im Zytoplasma (zur Übersicht: Moss et al., 1996). Dabei besitzen *Vaccinia*-Viren das breiteste Wirtsspektrum, sie infizieren nahezu alle Zellen sowohl in Menschen als auch in vielen Tieren, während die anderen *Orthopox*-Viren relativ wirtsspezifisch sind (Mayr et al., 1978). 1953 isolierte und reinigte Anton Mayr einen Dermovaccinia-Stamm (CVA). Dieses Virus wurde über fortlaufende Passage auf Hühner-Embryo-Fibroblasten weiter attenuiert, und heraus kam ein Virus, das in Tier und Mensch keine Virulenz mehr zeigte und selbst bei Hühnern nur zu einer mildereren Form der Infektion führte (Mayr et al., 1978). Ungeachtet dessen hatte sich das Virus bezüglich seiner Antigenstruktur und immunogener Eigenschaften nicht verändert und konnte weiterhin als Immunprophylaxe gegen alle durch Orthopockenviren hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Tier eingesetzt werden

(Mayr et al., 1978). Nach seinem Ursprungsort wurde dieses Virus *Modifiziertes Vaccinia-Virus Ankara* (MVA) genannt.

Molekulargenetisch betrachtet hat das Virus während der über 570 Passagen auf Hühner-Embryo-Fibroblasten 31 kb seines Genoms in Form sechs großer Deletionen verloren, darunter wenigstens zwei Gene, die das Wirtsspektrum und damit die Replikationskompetenz bestimmen (Meyer et al., 1991). Die Generation infektiöser Partikel ist bei MVA sowohl im Menschen als auch in den meisten anderen Säugetieren sehr spät auf der Stufe der Virus-Assemblierung blockiert. Das unterscheidet MVA von anderen attenuierten *Vaccinia*-Viren, wie NYVAC und ALVAC, deren DNA-Replikation bereits nicht mehr stattfindet (Tartaglia et al., 1992, Sutter and Moss, 1992). MVA wurde während der Pocken-Ausrottung sehr umfangreich eingesetzt und gilt daher als sehr sicheres Impfvirus im Menschen (Stickl et al., 1974). Zudem eröffnet die Möglichkeit, rekombinante *Vaccinia*-Viren herzustellen, den Einsatz als Impfstoff-Träger auch für andere Erkrankungen im Rahmen der Human- als auch der Veterinärmedizin. So wurden rekombinante MVA im Tiermodell erfolgreich als Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten, wie zum Beispiel *Influenza* (Sutter et al., 1994), SIV (Giavedoni et al., 1993; Hu et al., 1992; Israel et al., 1994, Barouch et al., 2001), HIV (Amara et al., 2001), HBV (Moss et al., 1984) und TBE („Tick-Borne-Encephalitis“) (Holzer et al., 1999) getestet. Klinische Versuche zur Sicherheit und Immunogenität im Menschen liegen zum Beispiel für folgende Ansätze vor: HIV (Clements-Mann et al., 1998; AIDS Vaccine Evaluation Group, 2001), *Hantaan* (McClain et al., 2000), Japanisches Enzephalitis Virus (Kanesa-thasan et al., 2000) und einige Tumore (Scholl et al., 2000; Eder et al., 2000; Borysiewicz et al., 1996).

Auch zur Malaria-Impfstoff-Entwicklung wurden verschiedene rekombinante *Vaccinia*-Viren eingesetzt. Dabei konzentriert sich der Großteil der Arbeiten auf CSP als Antigen. Immunisierungen von Mäusen mit rekombinanten *Vaccinia*-Viren allein (Lanar et al., 1996) und in Kombination mit DNA (Schneider et al., 1998; Sedegah et al., 1998; Gilbert et al., 1999; Degano et al., 1999), rekombinanten *Influenza*-Viren (Li et al., 1993; Rodrigues et al., 1994), virusähnliche Hefe-Transposon-Partikeln (Plebanski et al., 1998; Oliveira-Ferreira et al., 2000) oder auch rekombinanten *Toxoplasma gondii* (Charest et al., 2000) schützte vor der ansonsten letalen Infektion mit Nager-*Plasmodium spp.*

Der von uns verfolgte Ansatz eines Impfstoffs gegen das Merozoiten-Stadium auf der Basis von *Vaccinia*-Viren und MSP1 wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen untersucht. 1994 stellte J. S. Sandhu im Labor von J. F. Kennedy zwei *Vaccinia*-Viren des Western Reserve-Stamms her, die je einen Teil des *msp1*-Gens trugen (Sandhu and Kennedy, 1994). In einem zweiten Ansatz wurde die DNA-Sequenz der 575 C-terminalen Aminosäuren von MSP1 jeweils mit oder ohne *P. falciparum* Signal- und/oder Anker-Sequenz ebenfalls in das Western Reserve-Genom integriert (Yang et al., 1997). Keiner der genannten Gruppen war es jedoch möglich, das Gesamt-*msp1* in das Genom der Viren zu integrieren.

Im Labor von L. Qu wurde ein rekombinantes *Vaccinia*-Virus hergestellt, das eine Fusion aus Teilen von CSP, MSP1, MSP-2 und RESA zusammen mit IL-1 und einem Tetanus Toxin-T-Zelle-Epitop trägt (Dong et al., 2001). Alle Viren induzierten Antikörper in immunisierten Versuchstieren.

Bisher gibt es nur zwei Studien, die die schützenden Wirkung einer Immunisierung mit rekombinanten Vaccinia-Viren auf Stufe der Merozoiten untersuchten:

In einem Versuch mit vier rekombinanten Viren, die jeweils ein anderes Malaria-Antigene (RESA, MSP1, MSP-2 und AMA-1) tragen, wurde bei sechs von sechs *Saimiri*-Affen nach 2 Immunisierungen keine Antikörper gegen die Malaria-Antigene detektiert, und keiner der Affen war gegen die Infektion mit *P. falciparum* Merozoiten geschützt (Pye et al., 1991).

AMA-1, SERA und MSP1 als drei von sieben *P.f.* Antigenen wurden in das Genom des Virus NYVAC-Pf7 integriert (Tine et al., 1996). Resus-Affen, die mit diesem Virus immunisiert wurden, entwickelten Antikörper gegen MSP1 und drei weitere Malaria-Antigene (CSP, SSP2 und Pfs25). Im Humanversuch der Phase I und IIa zeigte dieses Virus jedoch eine variable Immunogenität und schützte nur einem von 35 Probanden vor Malaria (Ockenhouse et al., 1998). Allerdings können die Autoren beider Studien weder die Synthese der Viren, noch die Expression der Proteine schlüssig belegen.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Sowohl epidemiologische Studien, die durch unsere Gruppe durchgeführt wurden, als auch zahlreiche Immunisierungsversuche mit nativem MSP1 und rekombinant hergestellten MSP1-Fragmenten zeigen, dass MSP1 ein vielversprechender Kandidat zur Entwicklung eines Malaria-Impfstoffes ist. Allerdings besteht die native DNA-Sequenz *mSP1* zu 75% aus den Nukleotiden A und T, was die Klonierung der Gesamt-Gene in Systemen wie beispielsweise *E. coli* unmöglich machte. Durch die chemische Synthese der DNA-Sequenz, die für die Aminosäuresequenz von MSP1 des FCB-1-Stamms (MSP1F) kodiert, war es erstmals möglich, dieses Protein in seiner gesamten Länge sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Systemen heterolog herzustellen.

Wie erwähnt existiert MSP1 in Form zweier Prototypen, die sich in weiten Teilen ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Daher ist es letztlich unerlässlich, auch *mSP1* des zweiten Prototyps (*mSP1d*) entsprechend der synthetischen DNA-Sequenz der K1-Variante herzustellen. Diese Synthese wurde bereits durch W. Pan, Ch. Berberich, I. Türbachova und C. Fernandez begonnen und sollte im Rahmen dieser Arbeit abgeschlossen werden. Dieser Bereich bildet den ersten Teil der Arbeit.

Es ist bekannt, dass MSP1 als Hauptoberflächenprotein der Merozoiten das Ziel einer humoralen Immunantwort ist. Erstmals exprimiert wird *mSP1* aber während der Entwicklung der Parasiten in Hepatozyten. Um einen möglichst effizienten Impfschutz zu erhalten, ist es daher sinnvoll, neben der humoralen auch die zelluläre Immunantwort gegen MSP1 zu stimulieren, welche die Parasiten in den infizierten Hepatozyten als Ziel hat. Der zelluläre Zweig der Immunantwort wird sehr effektiv durch eine Virusinfektion stimuliert, was für den Einsatz eines viralen Trägerorganismus bei der Entwicklung eines experimentellen Impfstoffs auf Basis von MSP1 spricht.

Im zweiten Teil der Arbeit habe ich mich daher mit der Expression von *mSP1d* durch das hochattenuierte und für Versuche am Menschen zugelassene Vaccinia-Virus des Stammes MVA beschäftigt. Zu diesem Zweck sollten *mSP1*-tragende Viren hergestellt werden, die

anschließend in Immunisierungsversuchen an Mäusen auf ihren immunogenen Wirkung hin untersucht werden sollten. Dabei sollte die Stimulierung nicht nur durch Viren allein sondern auch in Kombinationen mit Proteinpräparationen von MSP1D erkundet werden. Die Analyse der Seren während und nach der Immunisierung sollte neue Erkenntnisse über die Induktion der humoralen und einer zellulären, MSP1-spezifischen Immunantwort liefern. Die Ergebnisse dieser Untersuchung soll Hinweise geben für weitere präklinische Studien an Rhesus-Affen, welche wiederum eine Voraussetzung für die sich daran anschließenden, klinischen Studien an Menschen sind.

2. ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

2.1 Abkürzungen

α	anti
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AMA-1	„Apical Merozoite Antigen 1“
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintri-phosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bis-AA	N, N'-Methylen-Bisacrylamid
BSA	Rinder-Serumalbumin („Bovine serum albumine“)
C-terminal	Karboxyterminal
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CM	Chloramphenicol
CSP	„Circumsporozoite Protein“
CTP	Cytosintri-phosphat
ddXTP	2',3'-Dideoxyribonukleotide
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
DOC	Desoxycholat
dXTP	2'-Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
GST	Glutathion-S-Transferase
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCA	Freund'sche Adjuvanz, komplett
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal calf serum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IFA	Indirekte Immunfluoreszenz („Indirect Immunfluorescence Assay“)
HLA	„human leukocyte antigene“
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-thio-D-Galaktopyranosid
Kan	Kanamycin
LB-Medium	Luria-Broth Medium
mAK	Monoklonaler Antikörper
MCS	„multiple cloning site“
MHC	„major histocompatibility complex“
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MSP-1	„Major Surface Protein 1“
MW	„molecular weight“ (Molekulargewicht)
N-terminal	Aminoterminal
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschlorid
NC	Nitrozellulose
NP 40	Nonident P 40
NTP	Ribonukleotidtriphosphate
OD	Optische Dichte
ori	„origin of Replication“ (Replikations-Ursprung)
p	Plasmid
<i>P.falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	PAA-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“ (isotonischer Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Kettenreaktion

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Ionenkonzentration
POD	Peroxidase
Poly(A)	Polyadenylierungssignal
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP II	Eukaryont. RNA-Polymerase II
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
ssDNA	Einzelsträngige DNA
TA	Tris-Acetat
Tab.	Tabelle
TBS	"Tris buffered saline"
TBST	"Tris buffered saline" + Tween 20
T. gondii	Toxoplasma gondii
TEMED	Triethylmethylethyldiamin
TRAP	„Thrombospondin related anonymous protein“
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX 100	TritonX 100
TX 114	TritonX 114
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
Vol.	Volumen
z. B.	zum Beispiel
wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid

2.1.1 Einheiten

A	Ampere
Bp	Basenpaar(e)
Ci	Curie
cpm	Zählimpulse pro Minute
Da	Dalton
g	Gramm/Erdbeschleunigung
h	Stunde(n) (lat. „hora“)
kD	Kilodalton
l	Liter
M	molar (mol/l)
min	Minute(n)
Mol	ca. 6,023 x 10 ²³ Moleküle
s	Sekunde(n)
U	Einheit der Enzymaktivität („unit“)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

2.1.2 Vorsätze

k	kilo	10 ³
m	milli	10 ⁻³
μ	mikro	10 ⁻⁶
n	nano	10 ⁻⁹
p	piko	10 ⁻¹²
f	femto	10 ⁻¹⁵

2.1.3 Basen/Nukleoside

A	Adenin/Adenosin
C	Cytosin/Cytidin
G	Guanin/Guanosin
T	Thymin/Thymidin
U	Uracil/Uridin

2.1.4 Nomenklatur der Aminosäuren nach IUPAC-IUB Vereinbarungen (1969)

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leuzin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Asp	D	Asparaginsäure	Phe	F	Phenylalanin
Cys	C	Cystein	Pro	P	Prolin
Gln	Q	Glutamin	Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure	Thr	T	Threonin
Gly	G	Glyzin	Trp	W	Tryptophan
His	H	Histidin	Tyr	T	Tyrosin
Ile	I	Isoleuzin	Val	V	Valin

2.2 Definitionen

In dieser Arbeit wurden zum Teil englische Fachausdrücke beibehalten, da entweder keine sinnvolle, oder nur eine umständliche Übersetzung ins Deutsche möglich ist.

„blocking“	Absättigung unspezifischer Bindungsstellen
„blot“	Transfer von Protein, DNA oder RNA auf Membranen
„boost“	Wiederholte Immunisierung mit dem gleichen Antigen
„challenge“	experimentelle Infektion nach einer Immunisierung
„knob“	Elektronendichte Ausstülpungen der Erythrozytenmembran
„maxiprep“	Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung und Aufreinigung aus <i>E.coli</i> mit hoher DNA-Ausbeute
„miniprep“	Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung und Aufreinigung aus <i>E.coli</i> mit geringer DNA-Ausbeute
„multiple cloning site“ umfaßt	DNA-Region, die die Erkennungssequenzen für mehrere Restriktionsendonukleasen
„pellet“	Sediment
„primer“	ss-DNA, die nach Paarung mit dem komplementären DNA-Strang bei der enzymatischen DNA-Synthese als Startstelle dient
„priming“	Erstkontakt des Immunsystems mit einem Immunogen
„tandem repeat“	sich wiederholendes, lückenloses Sequenzmotiv
„western blot“	Proteintransfer vom PAA-Gelen auf Nitrozellulose-Filter

3. MATERIAL

3.1 Laborausstattung

Brutschrank B5060 EC/CO2	Heraeus GmbH, Hanau
Computer-Hardware:	MacIntosh SE / 30 & II, Laserwriter Plus
Computer-Software	Heidelberger Druckmaschinen
Scanner Linoscan	Adobe Systems Inc., USA
Adobe Photoshop 5.0	Deneba Software Inc., Miami, USA
Canvas 3.5.5	Becton Dickinson
Cell Quest	DNASStar Inc., USA
DNASStar	Commisariat a l'Energie Atomique, France
DNA Strider 2.0	Niles&Associates Inc., CA, USA
EndNote Plus 3.0	Microsoft Corporation, CA, USA
Excel 98	Signal Analytics Inc., CA, USA
IPLabs 3.0	Microsoft Corporation, CA, USA
MS Word 98	Jingdong Liu; Salt Lake City, USA
MacPlasmap 2.05	Netscape Communications Corp., USA
Netscape Navigator 4,7	National Biosciences, Inc., MN, USA
Oligo 4.0-s	Leitz, Wetzlar
Durchlichtmikroskop	BTX; San Diego, USA
Elektro Cell Manipulator 600	EMBL, Heidelberg
Elektrophoreseapparaturen	ZMBH, Heidelberg
Elektroelutionsapparatur	MWG, Ebersberg
ELISA Reader	Sartorius, Göttingen
Feinwaage	Agfa-Gevaert; Frankfurt
Filmentwicklungsmaschine 9432/101	Leica; Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop Leitz DMR	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld
FluoroImager SI	Schütt, Göttingen
Gasbrenner GASI 3.340	Labotech
Gefrierschrank -80° C	Berthold GmbH, Wildbad
Gellrockner Modell 1125 B	Mettler, Göttingen
Grobwaage Typ 1474	Goos; Heidelberg
Kassetten für Autoradiographie	
Konfocales Mikroskop	
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B, RC-3B	DuPont, Bad Homburg
Labor pH-Meter	Knick
Leuchtplatte Rex	Messinstrumentebau GmbH, Erlangen
Lichtmikroskop Labovert	Leitz; Wetzlar
Magnetrührer	Bachofer; Degerschlacht
Mikrowellenherd	Phillips
Mini Protein-Gelelektrophoreseapparatur	
Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories; München
Netzgerät ECPS 3 000/150	Pharmacia, Dübendorf, Schweiz
Netzgerät LKB 2103 & 2197	LKB, Bromma, Schweden
Peristaltikpumpe Perex 10202	LKB, Bromma, Schweden
Pipetman Gilson P2, P20, P200, P1000	Abimed; Düsseldorf
Pipettierhilfe R.301	Tecnomara, Zürich
PhosphorImager BAS1000	Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan
Phosphoimager-Kassetten + Screens	Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan
Refrigerated Condensation Trap	Bachofer, Reutlingen
Rotoren SS-34, GSA, GS-3, SA 600	DuPont, Bad Homburg
Schüttelinkubator	Infors AG, Basel, Schweiz
Schüttler Eppendorf 5432	Migge, Heidelberg
Sonifier Cell Disruptor	Branson über Heinemann, Heidelberg
Speed-Vac-Concentrator Savant	Bachofer, Reutlingen
Spektrophotometer Ultrospect III	Pharmacia
Steril-Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Stickstofftank BT 40	L'air Liquide
Thermocycler „Robocycler“	Sratagene, Amsterdam
Thermoschüttler ISF-1-V	Adolf Kühner AG; Schweiz
Tischschüttelinkubator Typ 82/180	Infors AG, Basel, Schweiz
Tischzentrifuge, Biofuge A	Heraeus Christ AG, Zürich, Schweiz
Transluminator UVF	Herolab; Wiesloch
Ultrazentrifuge TLA 100	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA
UV-Handlampe Typ 70 481	Reichert,
UV-Stratalinker	Stratagene, Amsterdam
Vakuumpumpe, Beta	Heraeus Christ AG, Zürich, Schweiz
Videosystem CS 1	Cybertech; Berlin
Vortex-Genie	Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad, U3/7A	Julabo, Seelbach

Wasserbad, 1002
Zellkulturzentrifuge Romanta
Zentrifuge Mikrorapid K

GFL, Burgwedel
Hettich; Tuttlingen
Hettich, Tuttlingen

3.2 Verbrauchsmaterial

3MM Chromatographiepapier
4 Fast Flow, Sepharose Protein A beads
Acrylamidlösung 40%
Colloidal Blue Staining Kit
Coomassi Blue
ELISA 96 well plates
Eppendorf-Reaktionsgefäße 3810
Photomaterialien
Farbumkehrfilm Fujichrome P1600D
und Provia 400
Medical X-Ray Film
Hyperfilm-ECL
.Biomax
Handschuhe Glovex
Nickel-Agarose
Nunc Cell Factory (10 Etagen)
Nylonmembran „Hybond-NX
Objektträger
Objektträger für IFA
Pipettenspitzen für P2, P20, P200
Pipettenspitzen für P1000
PVDF-Membran „Immobilon-P“
Jetstar-DNA-Chromatographiesäulen
QIAquick-spin PCR Reinigungssäulen
Quarzglas-Küvetten
Zellkulturflaschen
Zellkulturschalen 3001/3004
Zellkulturschalen 10cm
Zellkulturverbrauchsmaterial (Plastik)

Vetter, St.Leon-Rot
Pharmacia, Schweden
AppliChem, Darmstadt
Novex, USA
Serva, Heidelberg
Nunc GmbH
Eppendorf, Hamburg

Fuji Photo-Film GmbH; Düsseldorf
Fuji Photo-Film GmbH; Düsseldorf
Amersham
Kodak
Beiersdorf, Hamburg
Qiagen, Heidelberg
Migge, Heidelberg
Amersham Life Science
Menzel Gläser, über Migge; Heidelberg
Hölzer; Dorfen
Abimed; Düsseldorf
Bayer; Mannheim
Millipore, Eschborn
Genomed
Qiagen; Hilden
Hellma, München
TPP,
Becton Dickinson
Greiner; Frickenhausen
Falcon; Heidelberg
Greiner; Frickenhausen
Nunc GmbH
TPP

Zellschaber

3.3 Chemikalien

Nicht aufgeführte Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von der Firma Merck AG, Darmstadt, Fluka AG, Buchs, Schweiz bzw. Neu-Ulm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe bezogen.

Acrylamid
Agarose

Ampicillin
Anhydrotetrazyklin
Aprotinin
Bacto-Agar
Bacto-Trypton
BCIP
BM Chemiluminescence Blotting
Substrat

Bromphenolblau
Caesiumchlorid
Chloramphenicol
Complete Mini Proteaseinhibitoren
DAPI
DiI C16
DMEM
DMP
DMSO
DTT
ECL Western Blotting Detection Kit

AppliChem, Darmstadt
Life Technologies; Scotland
AppliChem, Darmstadt
AppliChem, Darmstadt
Clontech
Sigma, Heidelberg
Difco Labs, Detroit USA
Difco Labs, Detroit USA
AppliChem, Darmstadt

Roche, Mannheim
Serva, Heidelberg
Roth, Karlsruhe
Serva, Heidelberg
Roche, Mannheim
Sigma, Deisenhofen
Molecular Probes, Göttingen
Eurobio
Sigma, Deisenhofen
Sigma, Deisenhofen
Serva, Heidelberg
Amersham

EDTA	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Formaldehyd	Marc, Darmsatdt
Gentamycin	Eurobio
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glykogen	Roche; Mannheim
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Kanamyzin	AppliChem, Darmstadt
NBT	AppliChem, Darmstadt
NP-40	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Glücksklee
o-Dianisidene (freie Base)	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl-Sulfat	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Protein.Assay	Biorad, München
Protein-Standard	Sigma, Deisenhofen
QuickChange™ site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
TLCK	Sigma, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Triton X 114	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva; Heidelberg
X-Gal	Serva, Heidelberg
Vectashield	Vector Laboratories; Burlingame, CA

3.4 Radioisotope

α [33P]-ddATP (3000 Ci/mmol)	Amersham&Buchler, Frankfurt/Main
α [32P]-ddCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham&Buchler, Frankfurt/Main
α [33P]-ddTTP (1000 Ci/mmol)	Amersham&Buchler, Frankfurt/Main
α [33P]-ddCTP (1000 Ci/mmol)	Amersham&Buchler, Frankfurt/Main

3.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche, Mannheim
DNA Polymerase	Roche, Mannheim
DNase I	Serva, Heidelberg
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
PNK	Biolabs; Schwalbach
Proteinkinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim
	Pharmacia, Freiburg
	New England Biolabs; Schwalbach
RNase A	Serva, Heidelberg
T7 DNA Polymerase	Pharmacia, Freiburg
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein

3.6 Seren und Antikörperkonjugate

mAk 5.2	Dr. G. Hui, University of Hawaii, Honolulu, USA
α -Kanninchen IgG FITC-Konjugat	Dianova, Hamburg
α -Maus IgG POD-Konjugat	Promega, USA
α -Maus IgG Cy3	Molecular Probes, Göttingen
α -Maus IgG FITC-Konjugat	Becton-Dickinson, Heidelberg
α -Maus IgG Rhodamin-Konjugat	Becton-Dickinson; Heidelberg
α -Maus IgG POD-Konjugat	Promega, USA
α -Maus IgG AP-Konjugat	Sigma, Deisenhoffen

α -Mensch IgG AP-Konjugat
 α -Sec61 β
 α -M6
 α -M7
 α -MSP1-42- Δ EGF

Promega, USA
FG Prof. Dobberstein, ZMBH

Folgende monoklonale Antikörper gegen das MSP-1 Protein wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jana McBride; Edinburgh, Scotland, zur Verfügung gestellt:

mAk 6.1, 7.1, 9.2, 9.5, 9.8, 10.3, 12.2, 12.4, 13.2, 15.2, 17.1, 17.2, 31.1

3.7 Primer

T3 (erweitert)	5' ATTAACCCCTCACTAAAGGGAACA 3'
T7	5' AATACGACTCACTATAG 3'
K1-p19-sense	ATGGGATCCGGCATGCTGAACATCTCC
K1-p19-anti	GGATCGATCTATTAACGTTAGAGCTGGAGCAAAAAATCCC
3D7-p19-sense	ATGGGATCCAATATTTTCACAGC
3D7-p19-anti	GGATCGATCTATTAACGTTGCTGGAGGAGCAGAATATCCC
ompA-sense	GGGAATTCATTAAGAGGAGAAAGGTACCATGAAAAAGAC AGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGG
ompA-antisense	GCGGATCCATCTTTTCGGAGCGGCCTGCGCTACGGTAGCGAA ACCAGCCAGTGCCACTGCAATCG
p19*stoptransfer sense	CGTTTCTGTTACTTCTACTGCTTCTGCTCCTGTTGCTTCTTTTACT GCTCAAGAGAAAGAGATACAA
p19*stoptransfer antisense	CGTTGTATCTCTTTCTCTTGAGCAGTAAAAGAAGCAACAGGAGCA GAAGCAGTAGAAGTAACAGAA
AIDA-sense	AATCCCGGGTAAATATTTTCACAGCATCAGTGCG
AIDA-anti	AATCCCGGGTAAACGTTGCTGGAGGAGCAGAATATC
DAF-sig.sense	GAAGATCTACGCGTATGACCGTCG
DAF-sig.anti	ATGGATCCCCACACGGCCGGCAG
GS83	GAATGCACATACATAAGTACCGGCATCTCTAGCAGT
IIIf1B	CACCAGCGTCTACATGACGAGCTTCCGAGTTCC

3.8 Plasmide

pPf-1	Dr. W. Pan, ZMBH
pBI-5/f-190-3,4 (= pHD190D)	Dr. P. Burghaus, ZMBH
pDS56RBSII,6xHis	Dr. D. Stüber, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
pZE21.mcs1	Dr. R. Lutz, ZMBH
pZE22.mcs2	Dr. R. Lutz, ZMBH
pIIIIdHR.ssP	Dr. G. Sutter, GSF, München
pIIIIdHR.p7.5	Dr. G. Sutter, GSF, München

3.9 Biologische Materialien

Bakterienstämme :

E. coli DH5 α :	K12F-, thr1, leu6, proA2, his4, thi1, argE3, lacY1, galK2, ara14, xyl5, mtl1, tsx33, strA31, sup37am1 -
E. coli DH5 α -Z1	
E. coli XL1 blue 2:	recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44, relA1, lac, (F'proAB, laq19, ZdM15, Tn10)
E. coli SG13009:	Kanamycin und Ampicillin-resistent, Lac-Repressor konstitutiv exprimiert
RK13-Zellen	Dr. G. Sutter, GSF, München
BHK21	Dr. G. Sutter, GSF, München

3.10 Material für die Kultur von E. coli

Antibiotikastammlösungen:

Ampicillin (Na-Salz):	50 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin:	25 mg/ml in Ethanol
Chloramphenicol :	10 mg/ml in Ethanol

LB-Medium:	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl
------------	---

LB-Platten:	LB-Medium 1,2% Bacto-Agar
-------------	------------------------------

3.11 Material für die Kultur von eukaryotischen Zellen

RPMI 1640 Mediumq	(31870-025) Gibco
Dulbecco´s Mod. Eagle Medium	(41966-029) Gibco
Minimal Essential Medium	(21090-022) Gibco
FCS	Clontech
Penicillin/Streptomycin Stammlsg.	Gibco
L-Glutamin 200 mM	Gibco
Trypsin/ETDA	Gibco

3.12 Puffer, Medien und Stammlösungen

3.12.1 Material für molekularbiologische Standardtechniken

TBjab Transformationspuffer:	10mM PIPES 15mM CaCl ₂ 250 mM KCl pH 6,7 (eingestellt mit KOH) 55 mM MnCl ₂ Sterilfiltriert
------------------------------	--

Einfriermedium:	TBjab Transformationspuffer +7% DMSO
-----------------	--------------------------------------

Lösungen für die "miniprep"-Methode

Lösung I:	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl,	pH 8,0
Lösung II:	0.2 M NaOH 1% SDS	
Lösung III:	3,2 M K-Acetat,	pH 5,5 (eingestellt mit Eisessig)
RNase A Stammlösung:	10 mg/ml	
Tris-EDTA-Puffer (TE):	10 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA	pH 8,0

Lösungen für die "maxiprep"-Methode

Resuspensionspuffer ("E1"):	50 mM Tris-HCL pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Lysispuffer ("E2"):	200 mM NaOH 1% SDS

Neutralisationspuffer ("E3"):	3,2 M K-Acetat, pH 5,5	
Äquilibriumspuffer ("E4"):	600 mM NaCl 100 mM Natriumacetat 0,15% Triton X-100	pH 5,0 (eingestellt mit Essigsäure)
Waschpuffer ("E5"):	800 mM NaCl 100 mM Natriumacetat	pH 5,0 (eingestellt mit Essigsäure)
Elutionspuffer: ("E6")	1,25 M NaCl 100 mM Tris-HCl, pH 8,5	

Lösungen für Dideoxysequenzierungen
(Fa. Amersham Life Science)

Reaktionspuffer (10x):	260 mM Tris/HCl 65 mM MgCl ₂	pH 9,5
Terminations Master Mix: je 7,5 µM	dATP dCTP dGTP dTTP	
Stopp-Lösung:	95% entionisiertes Formamid 20 mM EDTA 0,05% Xylencyanol FF 0,05% Bromphenolblau	

Reaktionspuffer für Enzyme

CIP-Reaktionspuffer:	50 mM Tris/HCl,	pH 8,0
CIP-Verdünnungspuffer:	50 mM Tris/HCl, 1 mM MgCl ₂ 0,1 mM ZnCl ₂ 40% Glycerin	pH 8,0
Ligase-Puffer:	20 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl ₂ 10 mM DTT 0,6 mM ATP	pH 8,0
PI-PLC-Puffer:	20 mM Tris 1 mM EDTA 0,01% Na-Azid 50% Glycerol	pH 7,5
PNK-Puffer:	50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl ₂ 10 mM β-Mercaptoethanol	pH 9,0
Hybridisierung-Puffer (10x):	1,5 M KCl	

Puffersystem für Restriktionsendonukleasen der Fa. Roche, MA (10x)
Bei abweichenden Bedingungen wurden die Herstellerangaben befolgt.

Puffer A:	330 mM Tris/Ac, 100 mM MgAc 660 mM KAc 5 mM Dithiothreitol	pH 7,9
Puffer B:	100 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl ₂ 1 M NaCl 10 mM β-Mercaptoethanol	pH 8,0
Puffer L:	100 mM Tris/HCl,	pH 7,5

	100 mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol	
Puffer M:	100 mM Tris/HCL, 100 mM MgCl ₂ 500 mM NaCl 10 mM Dithiothreitol	pH 7,5
Puffer H:	500 mM Tris/HCL, 100 mM MgCl ₂ 1 M NaCl	pH 7,5

PCR-Puffer

Reaktionspuffer für Taq-DNA Polymerase:	500 mM KCl 100 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl ₂ 1 mg/ml Gelatine	pH 8,3
MgCl ₂ -Stammlösung:	10 mM in H ₂ O	
dNTP-Mix:	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP,	pH 7,5

Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Loening-Puffer:	36 mM Tris/HCl 30 mM NaH ₂ PO ₄ 1 mM EDTA;	pH 7.8
Probenpuffer für Agarose-und PAA- Gele zur Auftrennung von ds-DNA:	6% Saccharose 0,01% SDS 0.02% Bromphenolblau 0.02% Orange G 0.02% Xylencyanol FF	
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml in H ₂ O	

Lösungen für die PAA-Elektrophorese von DNA

AA-Stammlösungen:

Native Gele:	30% AA, 0,8% Bis-AA, filtriert & entgast	
Denaturierende Gele:	40% AA, 2% Bis-AA, 8,3 M Harnstoff, filtriert & entgast	
Aufreinigungsgel für Oligonukleotide:	20% PAA, 1% Bis-AA, 8,3 M Harnstoff	
Präparative PAA-Gel (50 ml):	10 ml 30% PAA 2,5 ml 20x TA 100 µl TEMED 200 µl APS ad 50 ml H ₂ O	
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE):	40 mM Tris/HCl, 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA	pH 8,3
Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE):	90 mM Tris, 90 mM Borsäure 2 mM EDTA	pH 8,3

Formamid-Probenauftragspuffer: 95% Formamid
1x TBE
0,01% Bromphenolblau
0,01% Xylencyanol FF

Lösungen für die Isolierung von DNA Fragmenten

Isolierung aus PAA-Gelen

Elutionspuffer 3 M Na-Acetat
0,02% Bromphenolblau

Laufpuffer: 0,5x TBE

Isolierung aus Agarose Gelen

Silica (Sigma S-5631): 100 mg/ml in 3 M NaI

Resuspensionspuffer: 6 M NaI

Wasch-Puffer: 50 mM NaCl
10 mM Tris/HCl, pH 7,6
2,5 mM EDTA
50% v/v EtOH

Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen

AA-Stammlösung: 30% AA, 0,8% Bis-AA im Wasser

4x "Upper" Tris: 500 mM Tris pH 6,8
0,4% SDS

4x "Lower" Tris: 1,5 M Tris pH 8,8
0,4% SDS

Proteingel-Laufpuffer: 25 mM Tris ca. pH 8,3
250 mM Glycin
0,1% SDS

Sammelgel 3% (10 ml): 1 ml PAA
1 ml 4x "Upper" Tris Puffer
8 ml Wasser
20 µl TEMED
20 µl APS

Trenngel 8% (20 ml): 5,4 ml PAA
5 ml 4x "Lower" Tris Puffer
20 µl TEMED
100 µl APS

Probenauftragspuffer (zur Auftrennung von Proteinen):
3% SDS
25% "Upper"-Tris
20% Glycerin
0,02% Bromphenolblau
3% β-Mercaptoethanol

Bradfordlösung: 0,1mg Coomassie Brilliant Blue G250/ml in 8,5% H₃PO₄ und 5% EtOH,
filtriert.

Coomassie- Färbung

Coomassie-Färbelösung: 50% EtOH
10% Essigsäure
40% H₂O dest.

0,25% Serva Blue R
gelöst und filtriert

Entfärbelösung für Coomassie: 40% EtOH
10% Essigsäure
50% H₂O

Silberfärbung nach Heukeshoven (modifiziert)

Fixierlösung 1: 30% EtOH
10% Essigsäure

Fixierlösung 2: 30% EtOH
0,5M Na-Acetat
0,2% Na₂S₂O₃ x 5 H₂O
0,5% Glutaraldehyd

Färbelösung: 0,1% AgNO₃
0,02% Formaldehyd

Entwicklerlösung: 3% Na₂CO₃
0,02% Formaldehyd

Stopplösung: 1% Glycin

Fixierlösung 2, Färbelösung und Entwicklerlösung werden frisch angesetzt.

Lösungen für Immunoblot

Transfer-Puffer: 0,01% SDS
25 mM Tris
192 mM Glycin
20% Methanol

TBS-Puffer: 150 mM NaCl
10 mM Tris, pH 8,0

TBST-Puffer: TBS mit 0,2% Tween20

Absättigungspuffer: 5% Magermilchpulver
0,02% NaN₃, in TBST

AP-Puffer: 5 mM MgCl₂
100 mM NaCl
100 mM Tris, pH 9,5

NBT-Stammlösung: 50 mg/ml in 80% DMF

BCIP-Stammlösung: 25 mg/ml in 80% DMF

AP-Substratmix: 66 µl BCIP und 66 µl NBT/10 ml AP-Puffer

"Stripping"-Puffer: 0,1% SDS
1% Tween 20
0,2 M Glycin, pH 2,2 (eingestellt mit HCl)

Lösungen für Extraktion von RNA aus Säugerzellen

DEPC-Wasser 0,1% DEPC
2 – 3 Stunden bei RT schütteln (unter Abzug!), dann autoklavieren

GIT 4 M Guanidin-Isothiocyanat
25 mM Natriumcitrat
0,5% Sarkosyl pH 7,0 (eingestellt mit NaOH)
8 µl/ml β-Mercaptoethanol frisch zugeben

Lösungen für die elektrophoretische Auftrennung von RNA durch denaturierende Agarose-Gel-Elektrophorese

20x MOPS-Puffer	0,4 M MOPS 0,1 M Natriumacetat 20 mM EDTA	pH 7,0
10x Farbmix	0,1% Bromphenolblau 50% Glycerol	
Ladepuffer	1 µl 20x MOPS-Puffer 3,3 µl Formaldehyd 2 µl 10 x Farbmix Lösung wird frisch angesetzt	

Lösungen für „Northernblot“

20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat	pH 7,0 (eingestellt mit NaOH)
Transferpuffer	5x SSC 10 mM NaOH	
Neutralisationspuffer	5x SSC	
20 x SSPE	3 M NaCl 0,2 M NaH_2PO_4 20 mM EDTA	pH 7,4
niedrig stringenter Waschpuffer	2x SSPE 0,5% SDS	
hoch stringenter Waschpuffer	0,2x SSPE 0,5% SDS	
Prehybridisierungslösung	50% Formamid 5% SDS 6% PEG 6000 (w/v) 1 M NaCl 250 µg/ml Lachsspermien-DNA (Fragmentgröße zw. 300 – 3000 bp)	
Blockierlösung	0,2% Casein (frei von Alkalischer Phosphatase, RNase, DNase frei) 1 x PBS 0,5% SDS frisch anzusetzen	
Detektionspuffer	0,1 M Diethanolamin 1 mM Tris	pH 10,0
„Strip“-Puffer	0,2 M Glycin 0,1% Tween 20 0,1% SDS	pH 2,2

Immunaффinitätschromatographie:

TNET-Puffer:	1% Triton X-100 150 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris,	pH 7,4
TNET+NaCl-Puffer:	1% Triton X-100 650 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris,	pH 7,4
NET-Puffer:	150 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris,	pH 6,8

Borax-Puffer	50 mM Na ₂ B ₄ O ₇	pH 9,0
Ethanolamin-Lösung	0,3 M Ethanolamin	pH 8,0

Immunsisierung von Mäusen mit MVA

Tris/NaCl-Puffer	10 mM Tris/HCl 120 mM NaCl	pH 7,4
------------------	-------------------------------	--------

Immunsisierung von Mäusen mit rekombinantem Protein

NaPh/NaCl-Puffer	50 mM Na ₃ PO ₄ 500 mM NaCl	pH 8,0
------------------	--	--------

Lösungen für Indirekte Immunfluoreszenz (IFA)

MVA-infizierte HeLa Zellen, RK13-Zellen und BHK21-Zellen:

Fixierungslösung :	3,7% Formaldehyd in 1x PBS
Neutralisierungslösung:	50 mM Glycin in 1x PBS
Permeabilisierungs- und Inkubations-Lösung:	0,3% Triton X-100 in 1x PBS
Blockierungslösung:	10% BSA in 1x PBS
Waschlösung:	1x PBS

P. falciparum infizierte Erythrocyten:

Fixierungs- und Permeabilisierungslösung:	Aceton (eiskalt)
Blockierungslösung:	1% BSA in 1x PBS
Lösung zur Verdünnung der Antikörper:	0,5% BSA in 1x PBS
Waschlösung:	1x PBS

Lösung zur Kernfärbung mittels DAPI

Stammlösung:	50 µg/ml 4',6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI) in Methanol
gebrauchsfertig:	20 µl Stammlösung + 200 µl Wasser add 10 ml mit Methanol (finale Konzentration 0,1 µg/ml DAPI)

"Enzyme linked immunosorbent Assay" (ELISA)

Karbonatpuffer:	0,2 M Na ₂ CO ₃ 0,2 M NaHCO ₃ Vor Gebrauch 17 ml der 0,2 M Na ₂ CO ₃ 8 ml der 0,2 M NaHCO ₃ zusammen mischen ad 100 ml mit H ₂ O, pH 10,6
Blockpuffer:	TBS mit 1% Magermilchpulver 0,02% Azid

Substratpuffer:	4,8 ml Diethanolamin 250 μ l 2 M MgCl_2 ad 500 ml H_2O ,	pH 9,5	mit HCl einstellen
Färbereagenz:	15 min vor Gebrauch 1 mg/ml p-Nitrophenyl-Phosphat im Substratpuffer		
Stopplösung:	0,1 M EDTA		

4. METHODEN

4.1 DNA-Transfer in *E. coli* Zellen

4.1.1 Herstellung von *E. coli* Zellen für die Elektroporation

Von einer Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird zunächst eine Übernachtskultur (ÜNK) in 10 ml LB-Medium angesetzt. 200 ml LB-Medium werden 1 : 40 mit ÜNK angeimpft und die Zellkultur wird bis $OD_{600} = 0,6$ (2×10^8 Zellen/ml) gewachsen. In beiden Fällen erfolgt die Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator (180 Upm). Nach Erreichen der gewünschten OD wird die Kultur für 15 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden 5 min mit 6000 Upm (GS-3 Rotor) bei 4°C abzentrifugiert und anschließend in 200 ml MilliQ-Wasser (4°C, autoklaviert) resuspendiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt, bevor die Zellen in 15%iger Lösung von Glycerin in MilliQ-Wasser (4°C, steril) aufgenommen werden. Nach dem 50 µl der Zellen in der Elektroporation getestet wurden, aliquotiert man sie in gewünschter Weise (z.B. je 200 µl, Achtung: blaue Spitze abschneiden um Scheerung der Zellen zu vermeiden!). Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff erfolgt die Lagerung bei -80°C.

4.1.2 Elektroporation kompetenter *E. coli* Zellen

Die Zellen werden auf Eis aufgetaut. Je 50 µl der Zellen werden mit ca. 1 µg DNA gelöst, in Wasser gemischt und in auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Biorad, 2mm Ø) blasenfrei gefüllt. Die Elektroporation erfolgt bei einem Resistenzwiderstand von 72 Ohm und 2 kV (BTX 600 Electro Cell Manipulator). Unter diesen Bedingungen stellt sich die Zeit automatisch auf 0,3 msec. Auf die Zellen wird sofort 1 ml LB-Medium gegeben, danach werden sie mit einer Pasteurpipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 1h Inkubation bei 37°C werden sie 10 sec. bei 6000 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge sedimentiert, in 100 µl LB-Medium vorsichtig resuspendiert und auf entsprechenden Medien ausplattiert. Routinemäßige Elektroporationseffizienzen liegen je nach *E. coli*-Stamm zwischen 5×10^8 und $5 \times 10^9/\mu\text{g DNA}$ (Dower et al., 1988).

4.1.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die CaCl_2 -Methode (optimiertes Protokoll nach Inoue et al., 1990)

Von einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstammes wird zunächst eine Übernachtskultur (ÜNK) in 5 ml LB-Medium angesetzt. Mit 2 ml dieser ÜNK werden 500 ml LB-Medium angeimpft, bei 18°C in einem Schüttler inkubiert und bis $OD_{600}=0,6$ aufgewachsen (ca. 40 h). Nach Erreichen der erforderlichen Zelldichte wird die Bakterienkultur 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend werden die Zellen in der Kühlzentrifuge sedimentiert (5 min, 5000 Upm, 4°C). Der Überstand wird verworfen, die sedimentierten Zellen werden vorsichtig in 100 ml eiskalter Tbjab Lösung/2% (v/v) DMSO resuspendiert und danach erneut abzentrifugiert. Schließlich werden die Zellen in 80 ml eiskalter Tbjab Lösung (ohne DMSO) vorsichtig resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut in der Kühlzentrifuge pelletiert und das Sediment in 18,6 ml eiskalter Tbjab Lösung/2% DMSO aufgenommen. Danach werden zur Zellsuspension 1,4 ml kaltes DMSO gegeben (Endkonzentration 7%), die Bakterien für 10 min auf Eis stehen gelassen, schließlich in Aliquots zu 200 µl portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bem.: Es empfiehlt sich, alle Arbeiten im Kühlraum durchzuführen und vorgekühlte Materialien und Lösungen zu verwenden. Die auf diese Weise präparierten Zellen verfügen erfahrungsgemäß über eine Transformationseffizienz von $\sim 1 \times 10^9$ Transformanten pro 0,2 ml Zellsuspension und 1µg superhelikaler Plasmid-DNA.

4.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen nach der CaCl_2 -Methode

Zur Transformation werden die kompetenten Zellen auf Eis langsam aufgetaut und je 90 µl zur ebenfalls vorgekühlten DNA-Lösung gegeben (etwa 0,1pmol Plasmid-DNA eines Ligierungsansatzes oder 0,01pmol superhelikale DNA in max. Volumen von 10 µl im Wasser). Der Transformationsansatz wird 20 min auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz folgt ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C und eine anschließende Inkubation für 1 min auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium werden die Zellen für 45 min bei 37°C gehalten. Jeweils 80 - 200 µl werden auf selektive Medien ausplattiert und bei 37°C solange inkubiert, bis Bakterienkolonien sichtbar sind (gewöhnlich ÜN). Die Transformationseffizienz ist stark vom Bakterienstamm abhängig. Sie wird mit 1ng superhelikaler Plasmid-DNA (4Kb) ermittelt und beläuft sich auf 1×10^3 - 3×10^4 Transformanten pro Gesamtansatz.

4.1.5 Schnellmethode zur Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen

Dieses einfache und schnelle Transformationsprotokoll beschrieben von Pope&Kent (Pope and Kent, 1996), reduziert das Standardverfahren der Transformation (s.o.) auf nur wenige Minuten. Die DNA wird dabei mit 200 µl Zellsuspension (siehe Abschnitt 4.1.5.) gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wird der Transformationsansatz auf einem selektiven LB-Agar, der auf 37°C vorgewärmt wurde, ausplattiert.

Bem.: Die hier beschriebene Schnellmethode zur Transformation von CaCl₂-kompetenten Zellen zeigt eine etwa 3-fach niedrigere Transformationseffizienz, wenn die verwendete Plasmid DNA einen Kanamycin-Resistenzmarker trägt. Im Gegensatz zur Selektion mittels Ampizillin-, Tetrazyklin- oder Chloramphenicol-Resistenzmarkern erfordert die Transformation mit einer Kanamycin-Resistenz offensichtlich eine "Erholungsphase" der Zellen.

4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

4.2.1 Schnellmethode zur Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen ("Mini-Prep")

Die hier beschriebene Präparationsmethode ist abgeleitet von der Originalvorschrift Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979). Das Prinzip sei im Folgenden erläutert.

Die Zellen werden durch Detergenzeinwirkung und osmotischen Schock aufgebrochen. Danach erfolgt die alkalische Denaturierung der Nukleinsäuren. Wird anschließend der pH-Wert erniedrigt, so kommt es zur Renaturierung der Nukleinsäuren. Dabei findet eine intermolekulare Renaturierung der chromosomalen *E. coli* DNA statt, die zur Ausbildung einer hochmolekularen, netzartigen Struktur führt, während die Plasmid-DNA aufgrund der topologischen Verknüpfung der Einzelstränge intramolekular renaturiert. Proteine werden durch SDS denaturiert. Zelltrümmer, Membranteile, denaturierte Proteine und chromosomale DNA können anschließend durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA und RNA abgetrennt werden.

Die Präparation sei in Kurzform für 5 ml ÜNK dargestellt, sie erfolgt bei RT, soweit nicht anders angegeben.

Nach Abzentrifugieren von 1,5 ml der Zellen in 1,5 ml Eppendorfröhrchen (5 min, 8000 Upm, Tischzentrifuge) wird das Bakteriensediment in 150 µl Lösung I aufgenommen und mittels der Pipette gemischt. Der Zugabe von 150 µl Lösung II, mischen und Inkubation für 3,5-4 min auf Eis folgt die Zugabe von 150 µl Lösung III und mischen auf dem Vortex. Die Probe wird abzentrifugiert (10 min, 13000 Upm, Tischzentrifuge, 4°C) und der Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen vorsichtig überführt. Es wird 1 ml Isopropanol zum Überstand zugegeben und die Probe wird für 10 min inkubiert. Es folgt die Sedimentation der ausgefallenen Nukleinsäuren (20 min, 13000 Upm, Tischzentrifuge, 4°C). Anschließend wird der Nukleinsäurepellet in 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren (5 min, 13000 Upm, Tischzentrifuge, RT) wird der Überstand verworfen und das Pellet im "Speed-Vac"-Konzentrator getrocknet. Das getrocknete Sediment wird in 50 µl 1/10 x TE-Puffer aufgenommen.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA beträgt je nach Kopienzahl des Plasmids in der Zelle ausgehend von 1,5 ml ÜNK etwa 1-1,5 pmol.

Von der "Mini-Prep" DNA sind 5 µl für die Restriktionsanalyse bzw. zur Charakterisierung in Agarose-Gelen ausreichend. Die vorhandene RNA wird durch Zugabe von RNase A (Endkonzentration 0,2 µg/µl) und Inkubation der Probe für 15 min bei 37°C verdaut.

Zu Beginn können alternativ zu resuspendierten Zellen in Lösung I auch 150 µl der ÜNK selbst verwendet werden. Die Zellyse erfolgt in diesem Fall durch das in Lösung II enthaltenden Detergenz SDS.

4.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen über Anionenaustauscher-Chromatografie ("Maxi-Prep")

Die präparative Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgt nach einem modifizierten Protokoll der von Birnboim&Doly (Birnboim and Doly, 1979) beschriebenen Methode in Kombination mit einer Säulenchromatographie. Aufgrund ihrer Ladung lässt sich DNA über eine Anionen-Austauscher-Matrix reinigen. Zu diesem Zweck werden vorgepackte, kommerziell erhältliche Säulen (modifiziertes Silicagel) verwendet. Auf diese wird das Bakterienlysat in Gegenwart von 1M NaCl aufgetragen und anschließend gewaschen. Unter den gewählten Bedingungen bindet nur die Plasmid-DNA an die Matrix und restliche zelluläre Komponenten lassen sich dadurch entfernen. Die Plasmid-DNA wird durch die Erhöhung der Salzkonzentration eluiert und anschließend präzipitiert.

Die Aufreinigung wird wie folgt durchgeführt:

500 ml der ÜNK werden sedimentiert (5 min, 5000 Upm, Rotor GS-3), das Bakteriensediment wird in 10 ml Puffer E1 resuspendiert und in 50 ml Zentrifugenbecher überführt. Es werden 10 ml Puffer E2 zugegeben, die Probe wird vorsichtig gemischt und 5 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer E3 erfolgt das Mischen durch Invertieren des Gefäßes. Die Suspension wird für 20 min bei RT und 15000g sedimentiert. (Der Zentrifugationsschritt sollte wiederholt werden, wenn der Überstand nicht klar ist). Eine entsprechende Säule (z.B. Genomed Jetstar) wird mit 30 ml Puffer E4 äquilibriert und der Überstand des letzten Schritts auf die äquilibrierte Säule geladen. Nach Durchlauf des Bakterienlysates wird die Säule mit 60 ml Puffer E5 gewaschen. Die DNA wird anschließend durch 15 ml Puffer E6 eluiert und gesammelt. Durch Zugabe von 0,7fachem

Volumen Isopropanol wird die DNA gefällt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation (12000 Upm, 20 min bei 4°C im Sorvall HB-4 Rotor) gesammelt und anschließend mit 80%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA im "Speed-Vac"-Konzentrator erfolgt das Lösen der DNA in einem geeigneten Volumen TE-Puffer.

Die so gewonnene DNA ist von einer Qualität, die ihren Einsatz bei der Transfektion eukaryotischer Zellen ermöglicht.

4.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

4.3.1 Extraktion von Proteinen aus DNA-Lösungen

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen versetzt man diese mit dem gleichen Volumen an äquilibriertem Phenol.

4.3.1.1 Äquilibration des Phenols

Phenol muss vor Gebrauch äquilibriert bzw. sein pH-Wert eingestellt werden, zusätzlich wird es durch Zusatz von Antioxidantien haltbar gemacht.

Phenol bei 65°C schmelzen, 0,1 g 8-Hydroxyquinolin / 100 ml hinzufügen (Gelbfärbung). Mit jeweils dem gleichen Volumen 1M Tris/HCl, pH 8,0 solange ausschütteln, bis der pH-Wert der wässrigen Oberphase im neutralen Bereich liegt (pH 6,5-7,5). Zuerst mit 1x Vol. 0,1M Tris/HCl, pH 8,0, 0,2% β -Mercaptoethanol äquilibrieren, bevor es mit 1x Vol. 10mM Tris/HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, 0,2% β -Mercaptoethanol erneut äquilibriert wird.

Nach dem letzten Äquilibrationsschritt ist die wässrige Phase zu belassen. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt bei 4°C.

4.3.1.2 Phenol- und Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäurelösungen mit hohem Proteinanteil oder mit schwer zu inaktivierenden Enzymen (RNase A) werden mit reinem Phenol extrahiert. In der Regel genügt allerdings eine Phenol/Chloroform-Extraktion, bei der auf die nachfolgende Chloroform-Extraktion verzichtet werden kann.

Zur Extraktion werden die DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen an Phenol bzw. Phenol / Chloroform versetzt. Zur Vermeidung von Verlusten sollte, wenn möglich, bereits vor der Extraktion 1/10 Volumen vom 3M K-Acetat zugefügt werden. Beide Phasen werden durch kräftiges Schütteln gemischt und danach zur Phasentrennung zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5min, 13000 Upm). Die wässrige Oberphase wird abgenommen und bei Bedarf (sichtbare Interphase denaturierter Proteine) erneut extrahiert. Da zur weiteren Verwendung die DNA von Phenolresten befreit werden muss, erfolgt danach eine Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, gleiches Volumen). Anschließend wird eine Ethanolfällung durchgeführt und die DNA in einem gewünschtem Volumen 1x TE-Puffer aufgenommen.

4.3.2 Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen

4.3.2.1 Reinigung von Glykogen als Fällhilfe

Glykogen aus Austern wird in 1xPBS gelöst und 30 min mit 10 μ g/ml DNase I in Gegenwart von 8mM MgCl₂ bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Proteinkinase-K Behandlung (100 μ g/ml in Gegenwart von 0,1% SDS bei 50°C) und 2-Phenol sowie 1-Phenol/Chloroform-Extraktion. Die wässrige Phase wird 2x4 h gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Aus dem Lyophilisat wird eine Stammlösung von 100 mg/ml in MilliQ-Wasser hergestellt.

4.3.2.2 Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen und Ethanolpräzipitation

Lösungen mit sehr geringer Nukleinsäurekonzentration können durch Gefriertrocknen konzentriert werden, wobei darauf zu achten ist, dass je nach Salzgehalt der Anfangslösung relativ hohe Salzkonzentrationen auftreten können, die die nachfolgenden Reaktionen mit dieser DNA behindern könnten. Alternativ können Trägersubstanzen (tRNA, Glykogen) zugemischt werden, die eine anschließende Konzentrierung der DNA durch Ethanolpräzipitation erlauben. Bei der Ethanolpräzipitation wird die Nukleinsäurelösung zunächst mit 1/10 Volumen 3M Kaliumacetat versetzt, bevor das 2,5-3fache Volumen an -20°C kaltem Ethanol zugesetzt wird. Aus dieser nun ca.70%igen Ethanollösung fallen die Nukleinsäuren als Kaliumsalze aus. Zur quantitativen

Fällung aus Lösungen mit geringer Nukleinsäurekonzentration (weniger als 10 µg/ml) werden diese 20 min bei -80°C gekühlt. Nach Abzentrifugieren der Nukleinsäuren (Tischzentrifuge, 10min, 13000 Upm, 4°C) wird das Sediment mit 80%igem Ethanol gewaschen und im "Speed-Vac"-Konzentrator 1-2 min getrocknet. Die DNA kann dann in einem beliebigen Volumen 1xTE-Puffer oder Wasser aufgenommen werden.

4.3.3 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen

Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zu ihrer Extinktion bzw. Absorption. Diese Relation macht man sich bei der spektralphotometrischen Quantifizierung von wässrigen Nukleinsäurelösungen zu Nutze.

Von einer Verdünnung der gereinigten Nukleinsäure wird im Spektralphotometer die Absorption bei 260nm (Absorptionsmaxima der Nukleinsäuren) und bei 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Die Messung erfolgt in 500 µl Quarz-Küvetten. Es gilt folgende Relation zwischen gemessener Absorption und Konzentration der Nukleinsäure:

dsDNA: 1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml

ssDNA: 1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml

ssOligonukleotide: 1 OD₂₆₀ = 30 µg/ml

Ein Maß für die Verunreinigung mit Protein liefert das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀. Dieses sollte für proteinfreie Nukleinsäurelösungen 1,7-1,9 betragen.

4.3.4 Elektroelution in "Hochsals"

Elektroelution eignet sich für die Isolierung der DNA-Fragmente aus PAA-Gelen. Gegenüber Agarose-Gelen bietet die Verwendung von PAA-Gelen zur präparativen Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten den Vorteil, dass "Verunreinigungen" von superhelikaler Plasmid-DNA nicht in die PAA-Matrix eindringen. Somit kann störende ccc-Plasmid-DNA quantitativ von den zu isolierenden DNA-Restriktionsfragmenten abgetrennt werden.

Die betreffende DNA-Bande wird nach EtBr-Färbung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in die "Salzfalle", einer speziell für die Elektroelution angefertigten Apparatur gegeben. Dabei wird die DNA bei geringer Ionenstärke (1/2x TBE-Puffer, 160 V) aus dem Gelstück eluiert und wandert in ein sogenanntes "Hochsalzkissen" (75 µl an 3M Na-Acetat, angefärbt mit Bromphenolblau). Hier erfolgt ein Ladungsausgleich, wodurch die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA soweit reduziert ist, dass sie an der der Kathode zugewandten Seite des Salzkissens akkumuliert. Die Elution wird, abhängig von der Größe des DNA-Fragments, zweimal für 15-45 min durchgeführt. Dabei wird das Eluat (200 µl) jeweils mit einer 1 ml Spritze (wobei die Spitze der Kanüle abgeschnitten wurde) entnommen. Aus dieser Lösung wird die DNA mit 2,5fachem Volumen Ethanol gefällt, mit 80%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem adäquaten Volumen an TE-Puffer aufgenommen. Elutionen radioaktiv markierter DNA-Fragmente zeigten, dass Moleküle kleiner 200Bp praktisch quantitativ, Fragmente bis 1000Bp zu > 80% eluiert werden können.

4.3.5 Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen (Silica-Adsorption)

Für die DNA-Isolierung können mehrere Materialien, z. B. Glasmatrizen oder Ionenaustauschharze angewendet werden. In dieser Arbeit erfolgte die Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen über eine Silica-Matrix (Boyle and Lew, 1995).

Die Silica-Matrix (Sigma S-5631) wird in 1xPBS gelöst (100 mg/ml). Die Lösung wird für 2 h bei RT inkubiert, damit die Silica-Partikel sedimentieren können. Der Überstand, der die feinen Teilchen des Matrix-Materials enthält, wird vorsichtig entfernt, und das Verfahren wird einmal wiederholt. Nach einer Zentrifugation (2000g, 2 min) wird das Silica-Sediment in 3M NaI resuspendiert (Endkonzentration 100 mg/ml) und als DNA-Bindungsmatrix benutzt. Die Bindungskapazität beträgt 4-5 µg DNA pro mg Silikat.

Die Methode sei wie folgt kurz beschrieben :

Die DNA-Bande wird aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und das Gelstück gewogen. Es werden zwei Volumenanteile von 6M NaI bezüglich des Gelstückgewichts zugegeben und das Gelstück für 15 min bei 55°C im Heizblock unter gelegentlichem Mischen geschmolzen. Anschließend wird die Silica-Matrix (per 100 mg Gelmaterial 10 µl Silica-Matrix) hineingegeben und die Suspension 10 min. auf Eis unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Die Probe wird für 10 sec bei RT und 12000 Upm in der Tischzentrifuge sedimentiert, und das Silica-Sediment, das die gebundene DNA enthält, anschließend in 500 µl Waschpuffer resuspendiert.

Nach einer Zentrifugation von 10sec bei RT und 12000 Upm in der Tischzentrifuge wird dieser Waschschritt einmal wiederholt. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wird das Silica-Sediment in "Speed-Vac" Konzentrator getrocknet und die gereinigte DNA in zwei Schritten mit je 20 µl 0,1x TE-Puffer eluiert.

4.3.6 Aufreinigung synthetisierter Oligonukleotide ("primer")

Die Oligonukleotidlösung aus der Synthese wird mit 1xTE-Puffer auf 300 µl Vol. aufgefüllt. Verbleibendes Trägermaterial wird durch eine kurze Zentrifugation in der Tischzentrifuge abgetrennt und der Überstand mit 3 µl 1M MgCl₂, 50 µl 3M Na-Acetat, pH 5,2 und 900 µl 100% EtOH gemischt, 30 min bei -20°C inkubiert und gefällt. Nach 20 min Zentrifugation wird das Sediment in 80% EtOH gewaschen, in "Speed-Vac" Konzentrator getrocknet, danach in 300 µl 1xTE-Puffer gelöst und die Oligonukleotidkonzentration photometrisch bestimmt.

DNA-Oligonukleotide enthalten nach der Synthese nicht nur das gewünschte Produkt, sondern auch Nebenprodukte, die durch eine Gelelektrophorese abgetrennt werden. Hierzu ist es notwendig, intramolekulare Sekundärstrukturbereiche der Oligonukleotide aufzulösen, da diese das Laufverhalten in einem Gel beeinflussen. Polyacrylamidgele (6-20% PAA mit 8,3M Harnstoff, Vernetzungsgrad 40 : 1, Dicke 2,5 mm, 0,5x TAE-Puffer) werden für mindestens 1 h bei 25 V/cm "vorelektrophoresiert". Den Proben wird das 1,5fache Vol. an FA-Probenpuffer zugegeben. In der Regel wird der Lauf bei 25 V/cm für 1-2 h durchgeführt. Die Oligonukleotide werden durch Auflegen des Gels auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte und Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht sichtbar gemacht. Die Bande der entsprechenden Größe wird aus dem PAA-Gel herausgeschnitten. Aus ihr wird das Oligonukleotid 20 min bei 160 V in der Salzfall (4.3.4) eluiert, die oligonukleotidhaltige Salzlösung (200 µl) mit einer Kanüle entnommen und dieser Schritt noch einmal wiederholt. Anschließend werden die Oligonukleotide durch Zugabe von 100% EtOH gefällt und in 0,1x TE-Puffer aufgenommen.

4.3.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach der PCR müssen nicht eingebaute Nukleotide, "primer" und Enzyme vom Produkt abgetrennt werden. Dies kann durch eine PAA-Gelelektrophorese und die nachfolgende Isolierung der gewünschten Bande mittels Elektroelution erfolgen. Bei Verwendung von Agarose-Gelen wird die DNA mittels Silika-Adsorption gereinigt.

4.4 Analyse von Plasmid-DNA

4.4.1 Restriktionsanalyse

Die Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen dient u.a. der Analyse von Plasmiden, und im präparativen Maßstab zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur in vitro-Rekombination neuer Plasmide. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische dsDNA-Sequenzen erkennen und beide Stränge schneiden. Dabei unterscheidet man zwischen Restriktionsendonukleasen vom Typ I, II und III. Für die molekularbiologische Forschung sind hauptsächlich Typ II-Restriktionsendonukleasen von Interesse. Restriktionsendonukleasen des Typ II sind Enzyme, die 4-, 5-, 6- oder 8-bp lange, spezifische DNA-Sequenzen erkennen und dort beide Stränge der DNA schneiden. Dabei entstehen 5'-phosphorylierte und 3'-hydroxylierte Enden. Auf diese Weise ist es möglich, DNA-Moleküle sequenzspezifisch zu fragmentieren. Grundsätzlich benötigt jedes Restriktionsenzym individuelle Reaktionsbedingungen zur Hydrolyse, die vom Hersteller angegeben werden. Besitzen mehrere Restriktionsenzyme gleiche Anforderungen hinsichtlich der Reaktionsbedingungen, so kann eine DNA gleichzeitig mit einer Mischung dieser Enzyme fragmentiert werden. Analytisch werden etwa 0,1pmol der Plasmid-DNA fragmentiert. Das Ansatzvolumen ist abhängig von der Menge an Restriktionsenzym, die eingesetzt werden soll, da die Glycerinkonzentration (Restriktionsenzym-Lagerpuffer enthalten bis zu 50% Glycerin) im Ansatz 10% nicht überschreiten sollte. Die Menge an eingesetztem Restriktionsenzym pro Ansatz berechnet sich nach folgender Formel:

$$\mu\text{l einzusetzendes Enzym} = \frac{\mu\text{g} \times 50000 \times S}{\text{bp} \times K \times S^*}$$

µg	=	Menge der zu schneidenden DNA
S	=	Anzahl der Schnittstellen des Enzyms in der DNA
bp	=	Länge der DNA in Basenpaaren
K	=	Konzentration des Enzyms (U/µl)
S*	=	Anzahl der Schnittstellen des Enzyms im l-Genom

Die Inkubationszeit liegt bis auf wenige Ausnahmen wie PacI (ÜN) zwischen 0,5 h und 2 h. Hitzelabile Restriktionsenzyme werden durch 5-minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert, während hitzestabile Restriktionsenzyme über eine Phenol / Chloroform-Extraktion entfernt werden.

4.4.2 Analyse der DNA mittels Gel-Elektrophorese

Durchlaufen Nukleinsäuren im elektrischen Feld eine Trägermatrix (Gel) so werden sie infolge ihres konstanten Ladungs-Masse-Verhältnisses proportional zum Molekulargewicht, bzw. ihrer topologischen Form aufgetrennt. Je nach Art der Auftrennung, die man erreichen möchte, hat man die Möglichkeit zwischen verschiedenen Gelsystemen (Agarose-Gele, PAA-Gele) zu wählen, sowie durch Änderung der Polymerisationsbedingungen verschiedene Vernetzungs-grade im Gel zu erzeugen.

Das parakristalline Maschensystem der Agarose-Gele erlaubt die Auftrennung hochmolekularer DNA (einige 100 bis mehrere 1000 Basenpaare). Die Maschendichte wird von der Agarosekonzentration bestimmt, die zwischen 0,5 und 2,5% variiert werden kann.

Die durch Polymerisation entstandene, kovalent verknüpfte Matrix der Polyacrylamid-Gele erlaubt die Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle (Oligonukleotide bis Fragmente von wenigen kb). Bei diesem Gelsystem beeinflussen sowohl die Acrylamidkonzentration, als auch der Vernetzungsgrad seine Auflösungseigenschaften.

Die Herstellung, Verwendung und Behandlung der verschiedenen Gelsysteme ist prinzipiell von Sambrook et al., (Sambrook et al., 1989) beschrieben.

4.4.2.1 Auftrennung hochmolekularer DNA und topologischer Isomere im Agarose-Gel

Agarose-Gele finden Verwendung zur Auftrennung hochmolekularer DNA (>1000 bp). Man stellt dabei die topologische Form und die Größe von Plasmid-DNA fest. Normalerweise wird eine 0,8%ige Agarosesuspension in 0,5x Loening-Puffer angesetzt und durch Kochen im Mikrowellenherd gelöst. Nachdem die Lösung auf ca. 50-60°C abgekühlt ist, wird sie in eine mit einem "Kamm" bestückte Flachgelapparatur gegossen. Nach Erstarren der Lösung überschichtet man das Gel mit 0,5x Loening-Puffer (ca. 2-3 mm) und entfernt den Kamm. In die Aussparungen, die der Kamm hinterlassen hat, werden die Proben aufgetragen, welche zuvor mit 1/10 des Volumens mit DNA-Auftragspuffer (10fach konzentriert) gemischt wurden. Dies erleichtert auf Grund des hohen Saccharosegehalts (6%) das Auftragen der Proben. Darüber hinaus erlauben die im Auftragspuffer enthaltenen Farbmarker eine Kontrolle der während der Elektrophorese zurückgelegten Laufstrecke. Für 0,8%ige Gele gilt, dass Orange G an der Lauffront wandert, während Xylencyanol etwa mit einem DNA-Molekül der Größe von 2 kb komigriert. Die Elektrophorese wird bei 5-10 V/cm in einer Flachgelapparatur über die erforderliche Zeit durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wird die DNA im Agarose-Gel für 20 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) angefärbt und kann im UV-Licht (250-360 nm) sichtbar gemacht und photographiert werden. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei 20 ng pro "DNA-Bande".

4.4.2.2 Auftrennung niedermolekularer dsDNA in nativen PAA-Gelen

Zur Analyse von DNA-Fragmenten von 40 bis 2000 bp werden 4-8%ige PAA-Gele mit einem Vernetzungsgrad von 30:0,8 (AA:Bis-AA) in 0,5x TAE-Puffer benutzt. Zur Einleitung der Polymerisation werden der Acrylamidlösung nacheinander 0,2% TEMED (als Radikalstabilisator) und 0,4% APS (als Radikalstarter, 10% in H₂O) zugegeben. Danach wird die Lösung zügig und blasenfrei zwischen zwei Glasplatten gegossen (Polymerisationszeit ca. 30 min). Die Dicke der Gele beträgt in der Regel 1,0mm für analytische, und 2,5 mm für präparative Gele. Den Proben wird 1/10 Volumen DNA-Probenauftragspuffer zugegeben. Die Elektrophorese wird in einer Vertikalgelapparatur und mit 15 V/cm durchgeführt. In 6% PAA-Gelen wandert Xylencyanol mit DNA-Fragmenten von 250 bp, Bromphenolblau mit DNA-Fragmenten von 70 bp und Orange G kurz vor der Lauffront.

4.4.2.3 Anfärben von DNA in Gelen mit Ethidium-Bromid

Das Verfahren ist für Agarose- und PAA-Gele identisch. Ethidium-Bromid (EtBr) interkaliert in Nukleinsäuren und kann durch Bestrahlung mit ultrakurzwelligem Licht zur Fluoreszenz angeregt werden (optimale Intensität bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 254 nm).

Das Gel wird für 10-30 min in einer EtBr-Lösung (1 µg/ml) angefärbt. Unspezifisch in das Gel eingelagertes EtBr wird durch 10-30 minütiges Waschen in Wasser entfernt. Auf einer UV-Platte (Wellenlänge 203 nm) wird die angefärbte DNA sichtbar gemacht und kann unter Verwendung eines UV- und eines Orange-Filters fotografisch dokumentiert werden.

4.4.3 Enzymatische DNA-Sequenzierung nach Sanger

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine modifizierte Dideoxy-Kettenterminationsmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) angewandt. Es handelt sich um eine Entwicklung der Fa. Amersham Life Science (Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit). Die Methode beruht auf einer in vitro Replikation der DNA

mittels modifizierten Tag Polymerase DNA-Sequenzase DNA Polymease. Das Prinzip sei im Folgenden kurz erläutert:

Eine DNA-Matrize wird in vier verschiedenen Ansätzen sequenziert, dabei wird jedem Ansatz neben den vier 2'-Deoxynukleotiden (dXTPs) je ein 2',3'-Dideoxynukleotid (ddXTP) in einer relativ geringen Konzentration zugesetzt. Der statistische Einbau eines Dideoxynukleotids führt zum nukleotidspezifischen Abbruch der Vermehrung. Diese Reaktion liefert somit eine Population von Molekülen statistischer Größe. Allen Molekülen gleicher Größe ist gemeinsam, dass sie mit dem gleichen Dideoxynukleotid enden. Durch Vergleich der vier Ansätze mittels gelelektrophoretischer Auftrennung (4.4.3.1) kann nun jeder Position des vermehrten Moleküls ein ganz bestimmtes Nukleotid zugeordnet werden. Als Matrize wird in dieser Methode superhelikale Doppelstrang-DNA verwendet (ccc-Plasmide z.B. aus "Mini-Prep"). Um die Reaktion sequenzspezifisch innerhalb des Plasmids zu starten, wird ein kurzes, synthetisches Oligonukleotid ("Primer") mit entsprechend komplementärer Sequenz hybridisiert. Um eine Analyse durch Autoradiographie zu ermöglichen, werden zur radioaktiven Markierung der Produkte $\alpha^{33}\text{P}$ -ddXTPs verwendet, dies hat den Vorteil, dass nur DNA-Stränge detektiert werden, deren Synthese durch den Einbau der entsprechenden Terminationsnukleotide beendet wurde. Dies verhindert die Detektion von Kettenabbrüchen im anschließenden Autoradiogramm, die nicht durch den Einbau von ddXTPs bedingt wurden. Durch die Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerase kann die Sequenzierreaktion mehrere Zyklen von DNA-Synthese und anschließender Denaturierung des DNA-Doppelstrangs ähnlich der PCR (4.5.5.) durchlaufen, was zu einer Verstärkung des autoradiographischen Signals führt.

Die Sequenzierung wird nach folgendem Protokoll durchgeführt :

a) Vorbereitung der Terminationansätze:

Je Sequenzierung werden für jedes Nukleotid 2 μl Terminationsmastermix mit jeweils 0,5 μl $\alpha^{33}\text{P}$ -ddXTPs (G, A, T oder C) gemischt und in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. Dies entspricht 225 nCi je Nukleotid.

b) Vorbereitung der Reaktionsansätze:

Volumen je Sequenzierungsansatz:	20 μl
Reaktionpuffer (10x)	2 μl
DNA	50 – 500 ng oder 25 – 250 fmol
Primer	0,5 – 2,5 pmol
Thermo Sequenase Polymerase (4U/ μl)	2 μl

c) 4,5 μl des Reaktionsansatzes werde zu den jeweils 2,5 μl Terminationsmix zu gegeben und durch pipettieren gemischt.

d) Die Polymerisationsreaktion erfolgt im Thermocycler nach folgenden Zyklen (30x):

Denaturierung der DNA	30 sec,	95°C
Hybridisierung der Primer	30 sec,	60°C
Elongation	60–120 sec,	72°

e) 4 μl Stopplösung werden zu jedem Ansatz zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Anschließend werden die Proben 2-10 min. auf 70°C erhitzt und 3-5 μl direkt im Anschluß auf das Sequenziergel aufgetragen oder bei -20°C aufbewahrt.

4.4.3.1 Gelelektrophoretische Analyse von DNA-Sequenzierungsansätzen

Bei der Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) entstehen radioaktiv markierte ssDNA-Produkte, die entsprechend ihrer Länge durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

Zur elektrophoretischen Analyse einzelsträngiger DNA ist es notwendig, dem Gelsystem denaturierende Agenzien wie Harnstoff hinzuzufügen. Diese interagieren mit Wasserstoffbrücken gepaarter Basen und lösen dadurch Sekundärstrukturen auf, die das Laufverhalten von einzelsträngigen Nukleinsäuren entscheidend beeinflussen. Die niedrige Ionenstärke des Gelsystems stellt für den elektrischen Strom einen erheblichen Widerstand dar; die dadurch entstehende Wärme begünstigt zusätzlich das Aufschmelzen von Sekundärstrukturen.

Radioaktiv markierte ssDNA Produkte aus Sequenzierreaktionen (4.4.3) werden wie folgt analysiert:

Zum leichteren Abheben der Ohrenplatte wird diese mit einer 2%igen Dichlor-Dimethylsilan-Lösung (in Chloroform) behandelt. Überschüssige Silanlösung wird durch Waschen mit VE-Wasser entfernt. Für die Gelelektrophorese von Sequenzierungsansätzen werden 6%ige PAA-Gele mit 8,3 M Harnstoff verwendet (Vernetzungsgrad: 30:0,8, Dicke: 0,3 mm, 1x TBE-Puffer). Nachdem das Gel polymerisiert ist, entstehen durch Aufsätzen eines "Haifischzahn"-Kamms die für den Probenauftrag notwendigen Taschen. Das Gel wird 30 min. bei 25 V/cm vorelektrophoresiert, um es auf seine "Betriebstemperatur" (60-80°C) zu bringen. Die Taschen des Gels müssen vor dem Auftragen der Proben mit Laufpuffer ausgespült werden, da aus dem Gel diffundierender Harnstoff das Beladen des Gels und dadurch die Auftrennung ungünstig beeinflusst. Die Elektrophorese erfolgt bei 25 V/cm für 1-3 h in 1x TBE-Puffer.

Nach Beendigung der Elektrophorese wird die Ohrenplatte entfernt, und die DNA im Gel durch 20minütige Inkubation in 10% Essigsäure/20% Methanol fixiert. Anschließend läßt man sie Fixierlösung abtropfen und bedeckt das gesamte Gel mit einem trockenem Blatt 3 MM Chromatographiepapier. Das Gel wird mit dem Papier von der Glasplatte gelöst und auf diesem getrocknet (Gelrockner, mind. 2h, 80°C). Die Gele werden durch den Wasserentzug sehr dünn, was zu einer Verschärfung der Banden aufgrund der geringeren Streuung/Absorption der β -Strahlung führt. Die Autoradiographie erfolgt unter Verwendung eines Röntgenfilms

(3Tage, RT), oder durch Exposition einer Phosphoimager-Platte (ÜN, RT) und anschließende Analyse im Phosphoimager.

5.3.2 Analyse bakterieller Kolonien durch α -Komplementation

Plasmid der pSK-Serie (auch pBluescript genannt) tragen ein DNA-Segment unter Kontrolle des lac-Promotors, welches für die N-terminale 146 Aminosäuren der β -Galaktosidase (lacZ). Innerhalb der kodierenden Sequenz befindet sich eine multiple Klonierungsstelle, die weder das Leseraster stört noch durch die zusätzlichen Aminosäuren die Funktionsfähigkeit beeinträchtigt. Weder dieses Fragments noch der C-terminalen Teils des Enzyms welcher in den Wirtszellen (z.B. *E. coli* DH5- α) exprimiert wird, sind allein aktiv. Transformiert man nun diese Wirtszelle, welche für den N-terminalen Teil des Enzyms dominant negativ sind mit diesen Vektoren, können die beiden Teile jedoch einen enzymatisch aktiven Komplex bilden. Man nennt dieses Phänomen α -Komplementation. Die daraus resultierenden LacZ-positiven Bakterien können leicht identifiziert werden, da die Kolonien in Gegenwart des Substrats 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid (X-Gal) und des Induktors IPTG blau werden.

Wird nun ein weiteres Stück DNA in die multiple Klonierungsstelle innerhalb des N-terminalen Teil des β -Galaktosidase Gens eingefügt, so führt dies fast immer zu einer Änderung des Leserasters bzw. zu einer Produktion eines Aminosäurefragments, das nicht mehr fähig ist den C-terminalen Teil des Enzyms in der Wirtszelle zu komplementieren. Kolonien von Bakterien, die mit einem solchen Plasmid transformiert wurden erscheinen daher auch in Gegenwart von Substrat und Induktor weiß.

Um den Bakterien sowohl das Substrat als auch den Induktor bereitzustellen, werden auf entsprechenden Antibiotika enthaltenden LB-Platten erst 25 μ l IPTG-Lösung (1 M in Wasser, sterilfiltriert) und dann 50 μ l einer Lösung von 25mg/ml X-Gal in DMF ausgestrichen, bevor die Bakterien ausplattiert werden.

4.5 In vitro Modifikation und Rekombination von DNA

4.5.1 Dephosphorylierung der 5' Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Zur Vermeidung unerwünschter Ligierungen (z.B. Religation geschnittener Vektoren), entfernt man das 5'-Phosphat der DNA und erzeugt "freie" 5'-hydroxylierte Enden. Hierbei werden 0,1-10pmol DNA bei 37°C für 30 min im Volumen von 50 μ l mit 0,5U alkalischer Phosphatase inkubiert (Pufferbedingungen nach Herstellerangaben).

Bevor die Fragmente für die Ligierung eingesetzt werden können, muss das Enzym durch Phenol-Extraktion und anschließendes Ausfällen der DNA entfernt werden.

4.5.2 Phosphorylierung von 5'-hydroxylierten Enden durch Polynukleotidkinase

Das Enzym Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert die Übertragung der terminalen Phosphatgruppe von ATP auf das 5'-OH Ende von DNA-Fragmenten und einzelsträngigen Oligonukleotiden. Für eine quantitative Phosphorylierung verwendet man einen 3-5fachen molaren Überschuss an ATP gegenüber den Nukleinsäure-Enden, stellt die Pufferbedingungen des 20 μ l Ansatzes durch Zugabe von 10-fach konzentriertem PNK-Puffer ein und inkubiert bei 37°C für 20 min. Die eingesetzte Menge PNK beträgt 10U/20 μ l. Nach Beendigung der Reaktion wird das Volumen mit TE-Puffer auf 100 μ l erhöht und eine Phenol-Extraktion durchgeführt. Die phosphorylierten Fragmente werden mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und in entsprechendem Puffer aufgenommen.

4.5.3 Auffüllen von 5'-überhängenden, bzw. Entfernen von 3'-überhängenden, einzelsträngigen DNA-Enden durch T4 DNA-Polymerase

Für bestimmte Anwendungen, z. B. der Ligierung von DNA-Fragmenten mit nicht kompatiblen Enden, ist es notwendig, doppelsträngige und glatte Enden ("blunt ends") zu erzeugen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu das Enzym DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 verwendet. Das Enzym besitzt zwei unterschiedliche Aktivitäten: In der Gegenwart von Deoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) katalysiert es die Polymerisation an verkürzten Hydroxylenden von DNA-Fragmenten. Dadurch lassen sich 5'-überhängende, einzelsträngige DNA-Enden zu doppelsträngigen, glatten Enden auffüllen.

In Abwesenheit von dNTPs besitzt die Polymerase eine sehr aktive, einzelstrangspezifische 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch sich 3'-überhängende Enden entfernen lassen. Die Reaktion findet in einem Volumen von 20-50 μ l 1xT4-Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C statt. Zur Auffüllreaktion werden dem Ansatz 0,1 pmol dNTPs zugegeben.

4.5.4 Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphoryltermini doppelsträngiger DNA.

Eine Einheit des Enzyms (1U) ist definiert als die Ligasemenge, die notwendig ist, um die Konversion von 1nmol 32Pi in ATP bei 37°C in 20 min zu katalysieren (Weiss-Unit).

Die Menge an Ligase im jeweiligen Reaktionsansatz hängt von mehreren Faktoren ab, z. B. der Natur der zu ligierenden DNA-Fragmente ("blunt"-Enden oder Enden mit 3'- oder 5'-Überhängen), der Stabilität der Wasserstoffbrücken-Struktur, der Inkubationstemperatur und der Konzentration von DNA-Fragmenten.

In dieser Arbeit wurden alle Ligierungsansätze in 10 µl oder 15 µl Endvolumen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen werden mit 10x Ligase-Puffer eingestellt. Die Ligasekonzentration liegt bei 10U/ml. Die Menge an eingesetzter DNA bei Fragmentligierungen kann zwischen 0,05 und 2pmol liegen. Für Klonierungen wird das Insert in einem 3-5fachen molaren Überschuß bezüglich des Plasmids eingesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 16°C ÜN. Für die Elektroporation wird die DNA mit Ethanol gefällt, zweimal mit 80%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen. Davon werden 1-5 µl für die Elektroporation eingesetzt (Siehe 4.1.2). Für eine Transformation mittels der Kalzium-Chlorid-Methode kann die DNA direkt aus dem Ligationsansatz (1-10 µl) verwendet werden.

4.5.5 Enzymatische in vitro Amplifikation von DNA mittels Taq-Polymerase (PCR) Saiki et al., 1988

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann selektiv eine DNA-Sequenz in vitro amplifiziert werden. Die Synthese wird dabei an zwei "Primern" gestartet, die so gewählt sind, dass sie den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die PCR wird in einem sog. "Thermocycler" durchgeführt und besteht prinzipiell aus drei Schritten, deren einzelne Parameter für die jeweiligen "Template-Primer"-Kombinationen individuell optimiert werden müssen.

Der initiale Prozess ist die thermische Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge bei über 90°C für 15 Sek. bis 2 min. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes auf 45-65°C können die Primer sequenzspezifisch an die DNA-Matrize hybridisieren. Schließlich erfolgt beim Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase (72-74°C) die DNA-Neusynthese ausgehend von den 3'-OH-Enden der beiden an die Template DNA hybridisierten Primer.

Dieser Zyklus wird je nach den Erfordernissen 5-35-mal wiederholt. Das amplifizierte DNA-Fragment wird final durch Gel-Elektrophorese und anschließender Elution gereinigt. Alternativ können kommerziell erhältliche "Kits" zur Aufreinigung von PCR-Produkten verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Isolierung und Klonierung bekannter DNA-Sequenzen benutzt. Die verwendeten Primer besaßen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, wodurch sich DNA-Fragmente mit definierten Enden erzeugen ließen.

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden in Rahmen dieser Arbeit folgende Bedingungen gewählt:

Reaktionsvolumen	50 µl
Plasmid DNA-Matrize	0,05 pmol
"Primer"	je 25 pmol
Taq-Polymerase	1U
Nukleotide (dNTP's)	je 200 µM
Puffer	50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3
MgCl ₂	1,5 mM

Die Reaktion erfolgt in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen:

Nach einer initialen Denaturierung von 2 min bei 95°C verläuft die PCR im weiteren nach folgendem Zyklus (25 - 30x):

Denaturieren der DNA	30 sec, 95°C
Hybridisieren der "Primer"	1 min, 52-62°C
Elongation	1 min, 72°C

Nach 25 Zyklen wird die Reaktion durch eine 5-7 min Inkubation bei 72°C abgeschlossen und anschließend ein Aliquot der Reaktion (5-10µl) elektrophoretisch in einem kleinen Agarose-Gel (0,8 - 1%) analysiert.

4.5.6 Ortsspezifischer Nukleotidaustausch ("Site-directed Mutagenesis")

Diese Methode der in vitro Mutagenese (ausgehend von QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit Protokoll von Stratagene, Katalognummer: 200518) erlaubt einen schnellen Nukleotidaustausch in beliebiger dsDNA.

Für jede Reaktion, die zum Nukleotidaustausch führen soll, müssen zwei individuelle, zu einander komplementäre, mutagenisierende Oligonukleotide entworfen werden. Bei dem Entwurf der Mutageneseoligonukleotide sind folgende Regeln unbedingt zu beachten:

Die Länge der spezifischen Oligonukleotide liegt zwischen 25 und 45Bp. Die Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide muss mindestens 78°C erreichen und wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - \%mismatch$$

N steht für die Länge des Oligonukleotides (in bp).

Die eigentliche Mutation (Deletion oder Insertion) liegt in der Mitte des Oligonukleotides, wird also auf jeder Seite von 10-15Bp flankiert, die zu der Matrize-DNA komplementär sind und mit ihr zu 100% übereinstimmen. Der GC Gehalt des Oligonukleotides sollte mindestens 40% betragen. Verwendung von Oligonukleotiden, die mittels FPLC oder PAGE gereinigt wurden, steigert beträchtlich die Effizienz der Mutagenesereaktion.

Die Matrizen-DNA wird ausgehend von den mutagenisierenden Oligonukleotiden während der Amplifikation mit der PfuTurbo DNA-Polymerase II vermehrt. Nach dieser PCR entstehen neue DNA-Moleküle, die im Unterschied zu der Matrizen-DNA semimethyliert bzw. unmethyliert sind. Der Verdau mit der DpnI Restriktionsendonuklease (Erkennungssequenz: 5'-Gm6ATC-3'), die spezifisch nur methylierte und semimethylierte DNA-Sequenzen schneidet, führt zu einem Verdau der aus E.coli stammenden Matrizen-DNA und somit zur gleichzeitigen Selektion der mutierten, PCR-synthetisierten DNA.

Die PCR wird in folgender Zusammensetzung vorbereitet:

Puffer	5 µl
DNA-Plasmid	5-50 ng
Oligonukleotide	je 125 ng
dNTP Mix	200µM
ddH ₂ O	ad 50µl
PfuTurbo	2,5U

Die Anzahl der Zyklen sowie die Polymerisationszeit sind abhängig vom Typ der einzuführenden Mutation bzw. von der Länge des zu amplifizierenden Plasmids. Es gilt:

Punktmutation	12 Zyklen
Einfacher Aminosäureaustausch	16 Zyklen
Mehrfache Aminosäuredeletion/Insertion	18 Zyklen
Der initialen thermischen Denaturierung der DNA (95 °C, 30 sec) folgen:	
12-18 Zyklen	95°C 30 sec
	55°C 1 min
	68°C 2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids

Die Reaktion beendet, indem das Reaktionsgefäß für etwa 2 min auf Eis gekühlt wird.

Dem abgekühlten Reaktionsansatz werden 10U des DpnI Restriktionsenzymes zugegeben und mittels vorsichtigen Ab- und Aufpipettieren gemischt. Die folgende einstündige Inkubation bei 37°C ermöglicht den Restriktionsverdau des parentalen, nicht mutierten DNA Stranges.

1 µl des Reaktionsansatzes ist ausreichend für die Transformation von kompetenten E.coli Zellen (siehe 4.1.5) mit der zu erwartenden Anzahl von 50 bis 800 Kolonien. Laut Angaben des Herstellers beträgt die Effizienz 80%.

4.6 Analyse von rekombinanten Proteinen

4.6.1 Expression der MSP-1 Fragmente in E. coli

Die MSP-1 Fragmente tragenden Expressionsvektoren der pZ-Familie (Lutz and Bujard, 1997.) werden in die Tet-Repressor exprimierende Bakterienzelllinie E.coli DH5α-Z1 transformiert. Ausgehend von einzelnen Klonen mit den entsprechenden Plasmiden werden Kulturen angesetzt, bei 37°C unter starkem Schütteln hochgewachsen und in der frühen log-Phase ($OD_{600} = 0,2-0,4$) mit Anhydrotetrazyklin (200 ng/ml) induziert. Nach Inkubation bei 37°C unter starkem Schütteln für weitere 3-4 h werden 1 ml der Bakterienzellen 5 min bei 6000 Upm und RT sedimentiert. Das Sediment kann bei -20°C aufbewahrt oder in 200 µl Protein-Probenauftragungspuffer resuspendiert und anschließend 5 min aufgekocht werden, bevor 5 – 10 µl über SDS-PAGE (siehe 4.6.2) aufgetrennt werden. Der Zellextrakt wird anschließend entweder mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe 4.6.3) oder aber per „Immunoblot“ analysiert (siehe 4.6.5).

4.6.2 Analyse von Proteinen durch diskontinuierliche, denaturierende PAA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung kein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis. Durch Erhitzen wird die Polypeptidkette entfaltet, und durch Anlagerung des stark ionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Eigenladung des Proteins überdeckt. Dies führt zu einem annähernd linearen Laufverhalten bezüglich des Molekulargewichts. Die Gelelektrophorese wird, um scharfe Proteinbanden zu erreichen, in einem zweistufigen PAA-Gel durchgeführt, das sich durch einen pH-Sprung an der Grenze des relativ großporigen Sammelgels (3%, pH 6,8) zu dem darunterliegenden, engporigen Trenngel (8-12,5%, pH 8,8) auszeichnet. Der Fokussierungseffekt wird durch das pH-unabhängige Laufverhalten des "Leit-Ions" Cl⁻ gegenüber dem pH-abhängigen Laufverhalten des "Folge-Ions" Glycin bewirkt (Laemmli, 1970). Analytische Proteingele werden in einer Dicke von 1 mm hergestellt. Im Sammelgel wird eine Spannung von 8 V/cm, und im Trenngel von 20 V/cm angelegt. Vor dem Erhitzen (6 min, 100°C) wird den Proben der Protein-

auftragspuffer zugegeben. Bromphenolblau im Auftragspuffer ermöglicht es, den Verlauf der Elektrophorese zu verfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils 10 µl der Probe auf das PAA-Gel geladen (Abweichungen sind im Text angegeben). Da die Anwesenheit von reduzierenden Reagenzien, z. B. β-Mercaptoethanol oder DTT, die Konformation von Proteinen mit internen Disulfidbrücken stark beeinflusst, wurden im Rahmen dieser Arbeit SDS-PAGE sowohl unter reduzierenden (mit DTT oder β-Mercaptoethanol) als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dies kann sich auf das Laufverhalten im PAA-Gel und auf die spezifische Erkennung durch Antikörper auswirken.

4.6.3 Färbung von Proteinen in PAA-Gelen mit Coomassie-Blau

Zum Nachweis der Proteine wird das Trenngel 20-60 min bei RT in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Danach wird es mit Wasser abgespült und in Entfärberlösung gelegt. Unter mehrmaligem Wechsel der Entfärberlösung wird das Gel nun 1-12 h bei RT entfärbt und anschließend 1 h in Wasser gewaschen. Alternativ lassen sich Proteingele auch durch Aufkochen in Wasser (200 ml je Gel, 6 min. in der Mikrowelle) entfärben. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei dieser Methode bei 100-200 ng Protein pro Bande.

4.6.4 Silberfärbung von PAA-Gelen nach Heukeshoeven

Das Gel wird 1 h (oder ÜN) in Fixierlösung 1 geschwenkt. Nach 30 min Behandlung mit Fixierlösung 2 wird das Gel viermal je 15 min mit H₂O gewaschen. Es folgt eine 60 min Inkubation in der Färbelösung. Reste der Färbelösung werden durch kurzes Schwenken in H₂O und in Entwicklerlösung (je 20 sec) entfernt. Das Gel wird nun solange in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Banden ausreichend geschwärzt sind. Dies kann je nach aufgetragener Proteinmenge 20 sec bis 10 min dauern. Die Reaktion wird durch mehrmaliges Waschen mit Stopplösung beendet. Mit der Silberfärbung können 1 bis 10 ng Protein pro Bande sichtbar gemacht werden.

4.6.5 "Immunoblot" zur Identifikation rekombinanter Proteine

Der Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Immobilon-P, Millipore) findet in einer speziellen, horizontalen „halbtrockenen“ Blot-Apparatur statt. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladene Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf die Membran und werden dort über hydrophobe und z.T. auch elektrostatische Wechselwirkungen festgehalten. Zu diesem Zweck wird zu erst die PVDF-Membran kurz in Methanol angefeuchtet, dann sowohl das PAA-Trenngel als auch die Membran vor dem Transfer in Transferpuffer geschwenkt (5 min, RT) und anschließend zwischen ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchteten Lagen aus 3MM Chromatographiepapier wie folgt angeordnet:

- Kathode -
3 Lagen 3MM Chromatographiepapier
PAA-Trenngel
PVDF-Membran
3 Lagen 3MM Chromatographiepapier
+ Anode +

Hierbei ist darauf zu achten, dass die einzelnen Komponenten jeweils luftblasenfrei aneinander anschließen.

Der Elektrottransfer erfolgt bei 150 mA bei maximal 20 V für 1 – 1,5 h. Die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine können durch immunologische Methoden sichtbar gemacht werden. Zuerst bindet ein Primärantikörper an das nachzuweisende Protein. In einem zweiten Schritt erfolgt die Reaktion mit einem Sekundärantikörper. Dieser bindet spezifisch an den Fc-Teil des Primärantikörpers. An ihn ist das Enzym Peroxidase (POD) oder alkalische Phosphatase (AP) kovalent gebunden. Dies erlaubt bei Substratzugabe einen Nachweis des Proteins auf der Membran.

Das Prinzip der Luminol-Chemilumineszenzreaktion beruht auf der Emission von Photonen der Wellenlänge 425 nm bei der enzymatischen Umsetzung des Phtalhydrazides mit Wasserstoffperoxid durch POD zum entsprechenden Phtalat, Wasser und Stickstoff. Das emittierte Licht wird durch den Sensibilisator 4-Iodophenol verstärkt und kann mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Für die Reaktion wurde der "BM Chemiluminescence Kit" der Fa. Boehringer, Mannheim benutzt.

Wird als Sekundärantikörper das AP-Konjugat verwendet, entsteht aus den Substraten Nitrotetraazolumchloridblau (NBT) und Bromchlorindolylphosphat (BCIP) dank der AP-Aktivität ein schwarz-violetter Niederschlag, welcher auf der Membran sichtbar wird.

Nach dem Transfer der Proteine wird die PVDF-Membran wie folgt weiter behandelt:

Die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran werden durch das Schwenken in einem Absättigungspuffer (für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C) blockiert. Nach kurzem Waschen in 1x TBST wird die Membran mit Primärantikörper (verdünnt im Absättigungspuffer) überschichtet und bei RT für 1 h auf dem Schüttler oder stehend ÜN bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der PVDF-Membran (dreimal für je 5 min in 1x TBST) folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper-Konjugat (schwenkend für 30-90 min bei RT). Die Membran wird 3-4 mal für 5 min in 1x TBST gewaschen. Während des letzten Waschens wird die Reaktionslösung für die

Chemilumineszenz anhand der Herstellersangaben bzw. die Entwicklungslösung für die AP-vermittelte Reaktion (AP-Puffer mit NBT und BCIP) vorbereitet.

- Die Chemilumineszenzreaktion wird unmittelbar vor dem Auflegen des ECL-Hyperfilmes durchgeführt; dabei wird der NC-Filter für 1 min in der Reaktionslösung inkubiert. Anschließend wird die Membran mit Klarsichtfolie bedeckt und ein ECL-Hyperfilm aufgelegt. Die Expositionszeiten sind von der Stärke des Signals abhängig. Die Filme werden sofort in der Filmentwicklungsmaschine entwickelt.

- Wurde ein Sekundärantikörper-AP-Konjugat für die Reaktion angesetzt, sollte nach 1-30 min eine Färbung der Membran zu erkennen sein, und die Reaktion kann durch mehrmaliges Waschen mit Wasser (oder 20mM EDTA in PBS) gestoppt werden. Die Membran kann zwischen zwei Stücken 3MM Chromatographiepapier getrocknet werden.

4.6.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford (Bradford, 1976)

Proteine ergeben mit Coomassie Brilliant Blue G250 eine blaue Farbreaktion. Die Intensität der Färbung entspricht der Menge an Protein in einer Probe und kann durch die Messung der OD bei 595nm und den Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt werden.

Die Proteinlösung wird in 100 µl Wasser (max. 10 µl) verdünnt. Es werden 900 µl Bradford-Reagenz zugegeben und für 20-30 min bei RT inkubiert. Die Messung der OD₅₉₅ erfolgt in Photometer. Die Proteinkonzentration wird durch den Vergleich mit einer Eichkurve (versch. BSA-Konzentrationen) vermittelt.

4.7 In vitro Kultur von MVA (modifiziertes Vaccinia Virus Ankara)

4.7.1 Wachstum von MVA

4.7.1.1 Wirtszellen

In dieser Arbeit wurden die Viren in BHK21-Zellen ("baby hamster kidney cells") vermehrt. Zur Selektion rekombinanter MVA wurden teilweise RK13-Zellen ("rabbit kidney cells") verwendet, da in diese die Vermehrung nicht rekombinanter Viren nicht möglich ist.

Sowohl bei BHK21 als auch bei RK13-Zellen ist das Zellwachstum bei Kontakt mit den Nachbarzellen gehemmt, so dass sich konfluente, einschichtige Kulturen bilden. Die Passage von BHK21-Zellen erfolgt mittels Trypsinbehandlung. Dies sei für eine T25-Kulturflasche kurz erläutert:

Das alte Medium wird abgesaugt und ein mal mit sterilem 1x PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 2-3 ml Trypsinlösung überschichtet und ca. 10 min. im Brutschrank inkubiert, bis sich die adhärennten Zellen vom Boden ablösen. Die Zellen werden im vorgewärmte (DMEM) mit 5% hitzeinaktivierten FCS aufgenommen, mit einer Dichte von ca. 2000 Zellen/cm² auf neue Kulturflaschen verteilt und bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO₂ inkubiert. Die Kultur ist nach ca. 5 Tagen konfluent, d.h. ihre Zelldichte beträgt 3x10⁴ Zellen/cm².

Auch die Passage von RK13-Zellen erfolgt mittels Trypsinbehandlung. Dabei verbleibt jedoch die Trypsinlösung für 10-15 min. auf der konfluenten Zellschicht und die Inkubation erfolgt bei 37°C im Brutschrank. Anschließend werden die Zellen in vorgewärmtem (RPMI 1640) mit 7% hitzeinaktiviertem FCS aufgenommen.

Zur langfristigen Aufbewahrung werden die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Methode ist für BHK21 und für RK13-Zellen gleich. Zu Beginn wird das Medium von einer konfluent gewachsene Kultur in einer T75-Kulturflasche entfernt und die Zellen wie oben beschrieben über Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen werden in ein 15 ml Falcongefäß überführt und 5 min mit 1200 Upm bei RT pelletiert. Das Pellet wird in 1,5 ml FCS resuspendiert und anschließend mit Medium (DMEM/5% FCS bzw. RPMI1640/7%FCS) + 20% DMSO gemischt. Die Zellen werden nun in Einfriergefäße (Cryovials) zu je 1 ml aliquotiert, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließen für 1-2 Tage bei -80°C gelagert bevor sie schließlich in flüssigem Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen werden die Zellen in den Einfriergefäßen zunächst schnell auf 37°C erwärmt, bis das Einfriermedium zu tauen beginnt. Die Zellen werden nun direkt in 10 ml vorgewärmtem Medium (DMEM/5% FCS bzw. RPMI1640/7%FCS) überführt und anschließend mit 1200 Upm für 5 min bei RT pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend werden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in einer T75-Kulturflasche ausgesät.

Die Infektion mit Vacciniaviren verursacht bei BHK21-Zellen die Ausbildung eines starken Zytopathischen Effects (CPE), der letztlich zur Lyse der infizierten Zellen führt. Auf Grund dieses morphologischen Erscheinungsbildes lassen sich selektiv einzelne Klone infizierter Zellen "picken". RK13-Zellen zeigen nach Infektion mit MVA einen veränderten Phenotyp, jedoch nur bei Infektion durch Viren, welche das Selektionsgen K1L tragen. Dieses Gen erweitert das Wirtszellspektrum von MVA, so das diese Viren nun auch in RK13-Zellen zu infektiösen Partikeln assembliert werden können, während die Generation infektiöser Viruspartikel in Abwesenheit von K1L nicht möglich ist.

4.7.1.2 Passage und Amplifikation von MVA

Die komplette Lyse einer konfluenten BHK21-Kultur aus einer 25cm²-Kulturflasche (T25) ergibt ca. 1×10^7 - 1×10^8 infektiöse Viruspartikel.

Während der Infektion runden sich die Zellen ab, lösen sich letztlich vom Boden der Kulturflasche und lysieren. Um die vollständige Lyse und Freisetzung der Viren zu gewährleisten, wird die lysierte Zellkultur bei mind. -80°C (wahlweise auch Trockeneis) eingefroren und anschließend schnell wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wird insgesamt drei mal wiederholt, und damit die evtl. noch nicht lysierten Zellen aufgebrochen.

Zur weiteren Amplifikation können die lysierten Wirtszellkulturen benutzen werden, ohne dass eine weitere Aufreinigung notwendig ist. Für die Amplifikation größerer Mengen wird eine zu 90 – 95% konfluente BHK21-Kulture in einer 175cm²-Kulturflasche mit ca. 1×10^6 infektiösen Viruspartikeln infiziert.

Alternativ lassen sich MVA auch in CEF-Zellen ("chicken embryo fibroblast cells") vermehren.

4.7.1.3 Aufkonzentrierung von MVA

Werden hohe Virus-Titer benötigt, wie z. B. zur Immunisierung von Versuchstieren, so wird eine Konzentrierung der Virussuspensionen notwendig, da durch die Amplifikation von MVA in BHK21-Zellen lediglich Titer von 1×10^6 – 5×10^7 erreicht werden können.

Nachdem die amplifizierte Viruskultur drei mal eingefroren und wieder aufgetaut wurde, werden groben und unlöslichen Zellrückstände zunächst zwei mal je 15 min mit 2000xg (4°C, Rotor GSA) sedimentiert. Die Viren werden in einem zweiten Schritt mit mind. 25000g für 3 h pelletiert und anschließend in einem entsprechen geringen Volumen 1 mM Tris/HCl pH 9 aufgenommen und anschließend titriert.

4.7.1.4 Titration von MVA durch limitierte Verdünnung (TCID₅₀)

Um den Titer einer Virussuspension zu ermitteln werden zunächst BHK21- oder CEF-Zellen in 96 well-Platten ausgesät. Weisen diese Zellkulturen eine Konfluenz von ca. 80% auf, so werde sie mit Viren in entsprechenden Verdünnungen infiziert. Um zu gewährleisten, dass es sich bei der verwendeten Virussuspension um eine homogene Mischung handelt, und um zu verhindern, dass zusammenhängende Viruspartikel das Ergebnis der Titration verfälschen, wird die Ausgangssuspension ultrabeschallt. Dies geschieht unter Verwendung eines sogenannten "Cuphorn". Dieses ist eine Vorrichtung mit der sich auch Flüssigkeiten, welche sich einem geschlossenen Eppendorf- oder einem 15 ml Falcongefäß befinden, mit hoher Energie ultrabeschallen lassen. Beschallt wird die Virussuspension 1 min. einer Stärke von maximal 7 und einem Beschallungspuls von 30%. Zu beachten ist, dass die beschallte Probe während des Vorgangs permanent gekühlt wird.

Anschließend werden die Viren in log₁₀-Schritten ,beginnend mit 10⁻², verdünnt. Von jeder Verdünnung werden jeweils 100µl je Vertiefung in Replika von 8 auf die Zellen gegeben und anschließend für 4-5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Titer errechnet sich durch die Anzahl an Vertiefungen in denen die Zellen eine CPE zeigen, und wird anschließend mit Hilfe der Methode von Spearman & Kaerber errechnet:

Zuerst wird der log₁₀ der Verdünnung ermittelt, in der 50 % der Vertiefungen eine Infektion (CPE) zeigen:

$$\log_{10} = x - d/2 + (d \cdot r/n)$$

x = höchste Verdünnung, in der in alle 8 Vertiefungen CPE auftreten

d = log₁₀ des Verdünnungsfaktors ($d = 1$ bei 10fach Verdünnungen)

r = Anzahl der positiven Vertiefungen je Verdünnung

n = Gesamtzahl der Vertiefungen je Verdünnung ($n = 8$ bei Replika von 8 je Verdünnung)

Der reziproke Wert, der sich durch diese Rechnung ergibt, ist der Virustiter in Bezug auf die infektiöse Dosis je Volumeneinheit, d.h. in diesem Fall TCID₅₀/0,1 ml (da die Zellen in jeder Vertiefung mit 100µl Virusverdünnung infiziert wurde). Aus diesem Wert errechnet sich der Titer, der in der Regel in TCID₅₀/ml angegeben wird.

4.8 Expression rekombinanter Proteine durch MVA

4.8.1 Transiente Expression

Um die Funktionalität der verwendeten Expressionsplasmide zu überprüfen wird die transiente Expression des Proteins in MVA infizierten BHK21-Zellen ermittelt.

Zu diesem Zweck werden BHK21-Zellen mit Wildtyp-MVA infiziert und parallel mit Plasmid-DNA transfiziert. Das Protokoll sein im folgenden erläutert:

90 min. vor der Transfektion der DNA werden ca. 80% konfluente BHK21-Zellen mit einer Wildtyp-MVA infiziert (MOI = 10). Dies gewährleistet, dass alle zur Expression notwendigen Faktoren in der Zelle bereitgestellt werden.

In dieser Arbeit wurde die DNA mittels Kalzium-Phosphat-Transfektion in die eukaryotische Zelle gebracht. Bei dieser Methode nehmen die Zellen die DNA in Form von kleinen Kristallen aus DNA und Kalzium-Phosphat

auf. Die Effizienz der Aufnahme ist dabei abhängig von pH-Wert des Kulturmediums, der Partikelgröße der Kristalle, der Länge der Inkubationszeit sowie dem physiologischen Zustand der Zelle. 30 min. nach der Infektion der Zellen, bzw. 1 Stunde vor Zugabe des Präzipitates sollte das Kulturmedium (DMEM, 7% FCS) gewechselt und dessen pH-Wert durch Inkubation in einem Brutschrank mit 6% CO₂ auf 7,2 eingestellt werden.

Beim Einspritzen kleiner Aliquots der DNA (ca. 1,5 µg für ein 3,5 cm Schale, mind. jedoch 20 µg/ml) in 250 mM CaCl₂-Lösung in das gleiche Volumen 2x HBS-Puffer, beginnt die Ausformung kleiner Kalzium-Phosphat-Kristalle, die die DNA mit einschließen. Das Präzipitat soll sich für 30 min. bei RT formen. Danach wird es auf dem Vortex gemischt, in das Kulturmedium gegeben und zwischen 20 und 36 Stunden auf den Zellen inkubiert. Routinemäßig werden in einen 3,5 cm Schale 100 µl Präzipitat gegeben.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wird das Medium abgesaugt, die Zellen ein mal mit PBS gewaschen, anschließend in 1x Protein-Probenpuffer aufgenommen und im Westernblot analysiert.

4.8.2 Expression durch rekombinanten MVA

4.8.2.1 Etablierung rekombinanter MVA

Für die Gewinnung rekombinanter MVA nutzt man die hohe Rekombinationsrate, die bei Vacciniaviren beobachtet wird. So rekombiniert das Genom des Virus ca. 1 mal in 1000 Replikationen. Ebenso, wie im Fall der transienten Expression werden BHK21-Zellen mit Wildtyp-MVA infiziert und anschließend mit Plasmid-DNA transfiziert. Das transfizierte Plasmid trägt eine Expressionskassette mit einem Selektionsmarker (K1L), die stromaufwärts und stromabwärts von Sequenzen flankiert werden, die homolog sind zu Teilen des MVA-Genomes (in dieser Arbeit wurden Sequenzen verwandt, welche Deletionen in MVA-Genom flankieren). Diese Sequenzen führen zu einer gerichteten Rekombination und damit Integration der heterologen Sequenzen, die sich zwischen den homologen Abschnitten befinden.

Im Gegensatz zur transienten Expression beträgt die MOI hier nur 0,1, was zu einem hohen Überschuss an Plasmid-DNA im Vergleich zum MVA-Genom führt, dies begünstigt bei einer Rekombination wiederum die Insertion der Plasmid-DNA in das Genom.

Nach der Infektion und Transfektion inkubieren die Zellen ÜN bei 6% CO₂ und 37°C im Brutschrank. Danach bleiben sie weiter ein bis zwei Tage bei 5% CO₂ und 37°C und werden dann geerntet. Die Zellen werden im Medium mit einem Spaten abgeschabt, in einem 15 ml Falcongefäß 3 mal eingefroren (-80°C oder Trockeneis) und wieder aufgetaut (37°C im Wasserbad) und anschließend 3 x 1 min. ultrabeschallt (siehe 4.8.1). Danach wird die Suspension in log₁₀-Schritten in RPMI + 2% FCS verdünnt, und 3,5 cm Schalen mit 90% konfluenten RK13-zellen infiziert. Normalerweise werden Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻⁴ auf 6-well-Platten RK13-Zellen gegeben. Hier nun greift die Selektion mittels K1L. Dies ist ein vacciniaeigenes Gen, welches das Wirtszellspektrum erweitert und rekombinante MVA, die K1L tragen, ermöglicht in RK13-Zellen infektiöse Viruspartikel zu bilden. Die Infektion mit K1L positiven MVA bewirkt eine phänotypische Änderung der Zellen, dahingehend, dass das Zellwachstum angeregt wird, und die Zellen zudem in die dritte Dimension wachsen. Nach 3–4 Tagen treten regelrechten Zellklumpen auf, die aus der zweidimensionalen Zellschicht herausragen, sogenannten „Foci“, diese können dann als Virusklone mit einer 20µl-Eppendorfpipette „gepickt“ werden.

Da es durch den Überschuss an Wildtyp-MVA im Vergleich zu Recombinanten leicht zu Ko-Infektionen kommen kann, können auch Wildtyp-MVA in Gegenwart des Faktors K1L infektiöse Viren bilden. Daher ist es ratsam, Klone immer in der höchstmöglichen Verdünnung zu ernten, um den Anteil an Wildtyp-MVA zu minimieren. Die gepickten, infizierten Zellen werden in Eppendorfgefäße mit 500 µl RPMI (2% FCS) überführt, durch 3 x Gefrieren/Auftauen und Ultrabeschallen aufgebrochen, und so die Viren vereinzelt. Anschließend werden die Virusklone wieder auf neue RK13-Zellen ausplattiert und erneut selektioniert. Dieses Passagieren der Virusklone wird so lang weiter fortgesetzt, bis keine Wildtyp-MVA mehr nachweisbar sind (siehe 4.8.3.2.). Im allgemeinen reichen ca. 5-10 Viruspassagen auf RK13 aus.

Im nächsten Schritt wird K1L aus dem Genom der rekombinanten Viren entfernt. Dies hat zum einen Sicherheitsgründe, da es das Wirtszellspektrum wieder einschränkt, im weiteren ermöglicht es, K1L erneut als Selektionsmarker einzusetzen. Dadurch können mehrfachrekombinanten MVA etabliert werden. Das Gen ist von einem Satz Sequenzen flankiert, die zu sich selbst homolog sind. Diese rekombinieren und K1L wird somit aus dem Genom entfernt.

Zu diesem Zweck werden die Viren weiter auf 80% konfluenten BHK21-Zellen ausplattiert, und durch den fehlenden Selektionsdruck – BHK21-Zellen ermöglichen die Passage von MVA ohne K1L – wird der Selektionsmarker eliminiert. Die Passage erfolgt ähnlich wie bei RK13-Zellen, allerdings bewirkt die Infektion mit MVA bei diesem Zelltyp keine Bildung von „Foci“, sondern äußert sich in einen starken cytopathischen Effekt (CPE): die infizierten Zellen runden ab und lysieren schließlich. Das führt zu sichtbaren Löchern in der Zellschicht, den Läsionen, welche einzelne Virus-Klone repräsentieren. Auch bei der Passage auf BHK21-Zellen werden einzelne Virus-Klone gepickt, in diesen Fall in den abgerundeten, die Läsion umgebenden, infizierten Zellen. Um zu überprüfen, ob K1L aus dem Genom entfernt wurde, werden die Viren auf RK13-Zellen plattiert. Sind keine Foci mehr erkennbar, so haben die Viren die Fähigkeit zur Vermehrung in RK13-Zellen, und damit K1L, verloren. Im Normalfall dauert dies etwa 4-8 Passagen auf BHK21-Zellen.

Die Etablierung der rekombinanten Viren ist damit abgeschlossen, und die Viren können amplifiziert (siehe 4.7.1.2) und charakterisiert werden.

4.8.3 Analyse rekombinanter MVA

4.8.3.1 Isolierung von MVA-DNA

Um die DNA zu isolieren wird eine 3,5 cm Schale RK13-Zellen mit dem entsprechenden Virus überinfiziert (im Normalfall reicht die 10^{-1} -Verdünnung der Viruspassage aus), und die Zellen mit einem Zellschaber im Medium geerntet und 1 ml in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt. Wie schon bei der Viruspassage werden die Zellen 3x eingefroren und aufgetaut. Danach werden die groben Zellbestandteile durch Zentrifugieren bei RT (10 min., 2000 upm, Eppendorffzentrifuge) sedimentiert. 350 µl des Überstands werden mit 50 µl 10x TEN-Puffer, 50 µl 10% SDS und 50 µl Proteinase K (1 mg/ml in 1 mM CaCl_2) versetzt und für 1-4 Stunden bei 56°C inkubiert. Danach wird die DNA 2 mal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (25:24) extrahiert (siehe 4.3.1.2) und anschließend mit Ethanol präzipitiert (siehe 4.3.2.2). Das getrocknete Pellet wird in 50 µl 0,1x TE-Puffer aufgenommen.

Diese DNA kann nun zur PCR eingesetzt werden, zum einen um die Insertion eines heterologen Gens zu überprüfen, so sich das Protein nur schwer nachweisen läßt, oder um rekombinante Virusklone auf Wildtyp-MVA Reste hin zu untersuchen.

4.8.3.2 Test auf Wildtyp-MVA mittels PCR

Wildtyp-MVA unterscheiden sich von rekombinanten Viren durch die Insertion von Fremd-DNA in das Virusgenom. Wie schon erwähnt geschied dies über gerichtete Rekombination. Der Unterschied im Bereich der Insertionsstelle dient als Marker und wird über PCR (siehe 4.5.5) nachgewiesen. Die dazu gewählten „Primer“ sind komplementär zu den flankierenden Region, die die Insertion der heterologen Sequenzen vermitteln. Die durch die PCR amplifizierten DNA-Fragmente unterscheiden sich somit durch ihre Größe, und lassen sich über eine Agarose-Gel-Elektrophorese auftrennen (siehe 4.4.2.1).

Zur Amplifikation von MVA-DNA wurden in Rahmen dieser Arbeit folgende Bedingungen gewählt:

Reaktionsvolumen	50 µl
MVA-DNA-Matrize	5-10 µl
"Primer"	je 25 pmol
Taq-Polymerase	1U
Nukleotide (dNTP`s)	je 200 µM
Puffer	50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,3
MgCl ₂	1,5 mM

Die Reaktion erfolgt in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen.

Nachdem die DNA für 2 min bei 94°C denaturiert wurde, durchläuft sie folgenden Zyklus (30x):

Denaturieren der DNA	30 sec, 94°C
Hybridisieren der "Primer"	1 min, 55°C
Elongation	3 min, 72°C

Nach 25 Zyklen wird die Reaktion durch eine 7 min Inkubation bei 72°C abgeschlossen und anschließend ein Aliquot der Reaktion (10-20µl) elektrophoretisch in einem Agarose-Gel (0,8 - 1%) analysiert.

Werden durch die PCR nur noch DNA-Fragmente amplifiziert, die der Größe im rekombinanten Virus entsprechen, so ist der Virusklon „wildtyp-frei“. Ist das zu rekombinante Fragment sehr groß und läßt sich schwer amplifizieren, so können als Kontrolle für die Insertion zusätzlich auch „Primer“ verwendet werden, die innerhalb des heterologen Gens hybridisieren.

4.9 Nachweis von in vivo synthetisierten Proteinen in MVA-infizierten Zellen

4.9.1 „Immunoblot“-Analyse MVA-infizierter Zellen

Um die Expression von Proteinen in MVA-infizierten Zellen mittels „Immunoblot“ nachzuweisen, werden diese Zellen nach 2-4 tägiger Inkubation geerntet. Zu diesem Zweck wird das Medium entfernt, die Zellen in Proteinprobenpuffer aufgenommen, aufgeköcht und anschließend im PAA-Proteingel (siehe 4.6.2) aufgetrennt. Der immunologische Nachweis erfolgt nach der unter 4.6.5 beschriebenen Methode.

4.9.2 Immunperoxidase-Färbung

Bei der Immunperoxidase-Färbung werden Proteine in fixierten Zellen durch spezifisches Anfärben sichtbar gemacht. Nachdem die infizierten Zellen permeabilisiert und fixiert wurden, werden sie mit einem für das zu detektierende Protein spezifischen Antikörper behandelt. In einem zweiten Schritt wird dieser Primäntikörper über einen Sekundäntikörper gebunden, an den das Enzym Peroxidase kovalent gebunden ist. Dieses Enzym vermittelt im letzten Schritt eine Farbreaktion bei der o-Dianisidine zusammen mit Wasserstoffperoxid umgesetzt wird, das unter dem Mikroskop als brauner Niederschlag in den Zellen sichtbar wird.

Die Methode wird hier an Hand einer 3,5 cm Schale dargestellt:

Nachdem das Medium entfernt wurde, werden die Zellen 2x mit 1x PBS gewaschen (1ml/Schale). Durch Inkubation mit 1 ml Aceton/Methanol (1:1) für 5 min bei RT werden die Zellen fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Anschließend wird das Gemisch entfernt, die Zellen für ca. 5 min getrocknet und schließlich für 30 min bei RT mit 1 ml 2% FCS in 1x PBS inkubiert, um unspezifischen Bindungen der Antikörper zu minimieren (wahlweise auch ÜN bei 4°C). Im nächsten Schritt wird der erste Antikörper (in 2% FCS in 1x PBS) auf die Zellen gegeben und die Schale für 1 Stunde bei RT geschwenkt. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wird 2x kurz mit 1x PBS gewaschen bevor die Zellen bei RT für 1 Stunde mit dem zweiten Antikörper (in 2% FCS in 1x PBS) geschwenkt werden. Während dieser Zeit wird eine Spatenspitze o-Dianisidene mit 500 µl Ethanol auf dem Vortex gemischt und danach im Dunkeln aufbewahrt (45 min, RT). Ungelöstes o-Dianisidene wird im Anschluß kurz abzentrifugiert. Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper werden die Zellen 3x kurz und 1x 3 min mit 1x PBS gewaschen. 200 µl der gesättigten o-Dianisidene-Lösung wird mit 9,8 ml 1x PBS und 20 µl H₂O₂ gemischt, und die Zellen werden mit 1 ml dieser Lösung überschichtet. Die Färbereaktion läßt sich nach 10 – 90 min unter dem Lichtmikroskop erkennen und wird durch waschen mit Wasser abgestoppt.

4.9.3 Indirekte Immunfluoreszenz (IFA)

Auch durch indirekte Immunfluoreszenz kann die Synthese und die zelluläre Lokalisation eines Proteins in Zellen und Geweben unmittelbar durch Betrachtung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Nachdem die Zellen fixiert wurden, werden sie wie schon in der IPF mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Wahlweise können die Zellen zuvor auch permeabilisiert werden, abhängig davon, ob es sich um ein Oberflächen oder ein intrazellulär lokalisiertes Protein handelt. Auch dieser Antigen/Antikörper-Komplex wird über einen zweiten Antikörper gebunden. Im Unterschied zur IPF ist an den zweiten Antikörper kein Enzym sondern ein Fluoreszenzfarbstoff (FITC oder Rhodaminderivat) gekoppelt, der nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert, wodurch der Immunkomplex unter dem Mikroskop sichtbar wird.

Im Detail werden die Zellen wie folgt behandelt:

Für die Immunfluoreszenz werden die Zellen auf spezielle Glasobjektträger ausgesät, sogenannten „Chamber slides“. 1-2 Tage nach der Infektion werden sie 2x mit 1x PBS gewaschen (je max. 5 min) und anschließend mit 3,7% Formaldehyd in 1x PBS für 10 min. bei RT fixiert. Zur Neutralisation werden die Zellen danach 2x mit 50 mM Glyzin in 1x PBS gewaschen. Soll ein intrazelluläres Protein nachgewiesen werden, so werden die Zellen nun durch 5 minütige Inkubation mit 0,3% Triton X-100 in 1x PBS permeabilisiert. Das Triton X-100 wird durch 2 maliges Waschen mit 1x PBS entfernt und im Anschluß werden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 10% BSA in 1x PBS für 30 min bei RT abgesättigt. Nach zwei weiteren Waschstufen mit 1x PBS folgt die Inkubation der Zellen mit primärem Antikörper (in 2% BSA in 1x PBS) für 1 Stunde bei RT. Wahlweise lassen sich auch Doppelfärbungen durchführen, sofern die primären Antikörper durch unterschiedliche sekundäre Antikörper erkannt werden. Die Zellen werden anschließend 2x mit 1x PBS gewaschen, danach mit dem fluoreszenzmarkierten 2. Antikörper überschichtet und weitere 45 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Nach 3 weiteren Waschstufen mit 1x PBS werden die aufgesetzten Kammern entfernt, und die Zellen auf dem Objektträger mit „Moviol“ als Eindeckmedium unter einem Deckglas luftblasenfrei eingebettet. Diese Eindeckmedium konserviert das Präparat und verhindert das schnelle Bleichen der Fluoreszenzfarbstoffe, die Präparate sind so bei 4°C im Dunkeln mehrere Tage bis Wochen haltbar. Die Präparate werden im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.9.4 Nichtradioaktive „Northernblot“ Analyse (Low, 1998)

Die Expression eines Gens kann nicht nur durch sein Genprodukt das Protein nachgewiesen werden. Läßt sich ein Protein beispielweise nur schwer nachweisen, so kann die Genexpression auch auf der Stufe der Transkription analysiert werden.

Die „Northernblot“ Analyse basiert auf einer spezifischen Interaktion der transkribierten mRNA mit einem mittels Biotin markierten DNA-Fragment. Nachdem die RNA über denaturierenden Agarose Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt wurde, wird sie beim „Blotting“ mittels Osmose auf eine Nylon-Membran (Hybond-NX, Amersham) übertragen, dort über nichtkovalente Wechselwirkungen immobilisiert und schließlich durch UV-Kopplung kovalent mit der Membran verbunden. Nachdem sie auf diese Membran gebunden wurde, kann das markierte DNA-Fragment an die komplementäre RNA hybridisieren. Die Biotin-Markierung der DNA wird durch Streptavidin gebunden, das kovalent mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Das Enzym katalysiert die Spaltung des Dioxetan-Substrats CDP-Star bei der Lichtquanten frei werden, die wiederum über einen Chemilumineszenz-Film detektiert werden.

4.9.4.1 Extraktion der mRNA aus Säugerzellen

Das Arbeiten mit RNA erfordert ein hohes Maß an Sorgfalt, da die Moleküle sehr leicht durch RNase abgebaut werden. Es ist daher unabdingbar, Kontamination mit RNasen zu vermeiden, z.B. durch den Gebrauch von DEPC-behandeltem Wasser, bzw. Reinigung der Apparaturen mit 1% SDS gefolgt von 0,2M NaOH.

Zur RNA-Extraktion werden die Zellen mittels $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS oder alternativ mit Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend werden die Zellen in 15 ml Falcongefäßen für 5 min bei RT in der Zellkulturzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird kurz im Ethanol/Trockeneis-Bad tiefgefroren, bevor es in kaltem GIT + β -Meracptoethanol (8 μ l/ml GIT) resuspendiert wird. Die verwendete Menge an GIT ergibt sich aus der zu resuspendierenden Zellzahl. Dabei wird für ca. 2 mio Zellen 1 ml GIT eingesetzt und die Suspension anschließend 30 sec auf dem Vortex gemischt. Im weiteren ist darauf zu achten, dass die RNA-Aufarbeitung unter ständiger Kühlung stattfindet. Nachdem die Zellen lysiert wurden, wird 1/10 Volumen (in Bezug auf Zellen + GIT) 2 M Natriumacetat pH 4 zugegeben und die Suspension wieder auf dem Vortex gemischt, wobei sie durch die pH-Veränderung gelb wird. Durch die Zugabe von 1 Volumen „saurem Phenol“ (Phenol, das mit Wasser äquilibriert wurde und daher einen pH von 4 besitzt) wird die RNA sowohl von der DNA als auch von Proteinbestandteilen getrennt. Letztere wandern beim folgenden Mischen auf dem Vortex in die organische Phase und können aus dieser durch die Fällung mit Ethanol separat extrahiert werden. Nach der Zugabe von 0,2 Volumen Chloroform, inkubiert das Gemisch 15 min auf Eis, bevor die wässrige und die organische Phase durch Zentrifugation bei 5500 Upm für 5 min und 4°C in der Heraeuszentrifuge getrennt werden. Die wässrige Phase, welche die RNA enthält wird anschließend in ein „Snapcup“ überführt, und die RNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und darauffolgendes Kühlen auf -20°C (1 h) gefällt. Pelletiert wird die RNA bei 8000 Upm und 4°C für 10 min (Rotor: SM24, Beckmannzentrifuge), das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 500 μ l GIT aufgenommen. Um noch vorhandene Verunreinigungen mit DNA oder Proteinen zu entfernen wird die Extraktion beginnend mit der Phenol/Chloroform Extraktion wiederholt. Das Pellet wird nach der Fällung durch Isopropanol/Ethanol und anschließendem Trocknen in 10 μ l Formamid je 1 mio ursprünglich eingesetzter Zellen \bar{N} bei 4°C rückgelöst, und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 4.3.3). Wahlweise kann die RNA auch in DNase-Puffer rückgelöst werden. Die folgende Inkubation mit DNase (RNase-frei) und die damit verbundene Hydrolyse möglicher DNA-Reste verhindert später eine Hybridisierung der markierten DNA-Sonde mit dieser DNA. Dies könnte bei ähnlicher Größe der RNA-Moleküle und der DNA zu Fehlinterpretationen führen, da sich diese nicht unterscheiden lassen. Die RNA wird anschließend noch einmal wie oben beschrieben phenolisiert, gefällt und in Formamid aufgenommen. Die Qualität der RNA-Präparation wird bestimmt durch Agarose-Gel-Elektrophorese im 1% Agarose in 1x TBE, aufgetragen wird ca. 0,5 μ g RNA.

Alternativ kann anstelle von GIT und „saurem Phenol“ TRIzol® Reagenz (Gibco Life Technologies) verwendet werden. In diesem Fall erfolgt die RNA-Extraktion nach den Angaben des Herstellers.

4.9.4.2 Biotin-Markierung des DNA-Fragments mittels PCR

Die PCR bei der Biotin-Markierung erfolgt nach den unter 4.5.5 angegebenen Standardbedingungen mit Ausnahme der Nukleotidzusammensetzung: Von den Nukleotiden dATP, dCTP und dGTP werden Konzentrationen von 250 μ M je Nukleotid eingesetzt, für dTTP jedoch 125 μ M und zusätzlich 125 μ M Biotin-gekoppeltes dUTP (B-dUTP).

4.9.4.2 Elektrophoretische Auftrennung der gesamt RNA durch denaturierende Agarose Gel-Elektrophorese

Die in Formamid rückgelöste RNA wird über ein 0,8% Agarose Gel in 1xMOPS-Puffer und 2,2 M Formaldehyd aufgetrennt. Das Gel wird mit einem Volumen von 60,6 ml in einer horizontalen 14 x 11 cm Gelapparatur gegossen. Wichtig ist, dass das Gel an allen Stellen gleich dick ist. Im weiteren ist darauf zu achten, dass sowohl der 20 x MOPS-Puffer (3 ml) als auch das Formaldehyd (10 ml) erst ca. 30 sec nach dem Aufkochen der Agarose in Wasser zugegeben werden. Das Gel wird dann direkt unter dem Abzug gegossen und 40 min abgekühlt um das überschüssige Formaldehyd bei RT abzdampfen. Danach wird es mit 1x MOPS-Puffer überschichtet.

In der Zwischenzeit werden die RNA-Proben wie folgt aufbereitet: Jeweils 10 μ g RNA werden mit Formamid auf ein Volumen von 13,7 μ l verdünnt, mit 6,3 μ l frischem Ladepuffer gemischt, 10 min bei 65°C erhitzt und 5 min auf Eis gekühlt, bevor sie auf das Gel aufgetragen werden. Als Kontrolle dient HeLa-Zell-RNA, der zusätzlich zum Ladepuffer Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) zugegeben wird. Die Auftrennung erfolgt unter dem Abzug bei 100 V bis zu einer Laufstrecke von ca. 6 cm (1,5 – 2 Stunden).

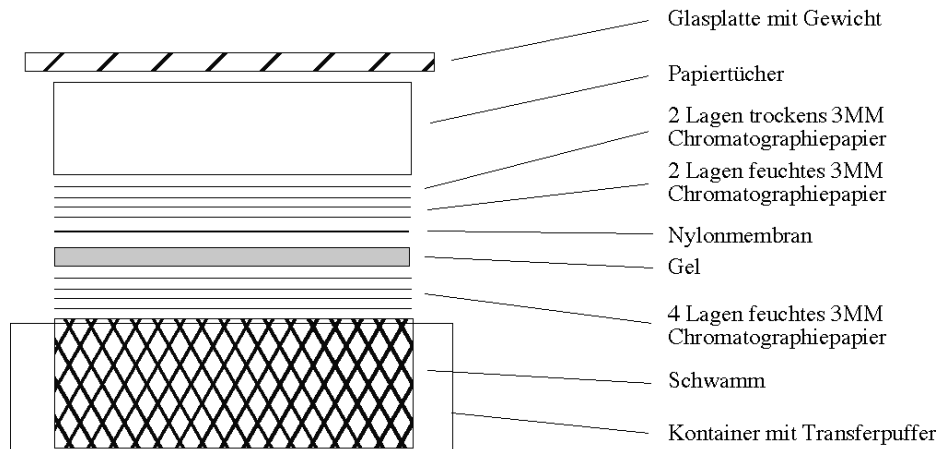
4.9.4.3 “Nothernblot”

Nach der Elektrophorese werden die Ränder des Gels abgeschnitten um durch die Meniskem verursachte Unebenheiten zu entfernen. Das Gel wird 2 x 10 min mit der Oberseite nach unten in Transferpuffer geschwenkt, und dabei die aufgetrennte RNA denaturiert. Auch die Nylonmembran wird in Transferpuffer befeuchtet.

Der Blot sollte wie folgt aufgebaut werden:

Zu beachten sind dabei, dass der Schwamm vorher kurz mit 1% SDS „gewaschen“ und nach dem Entfernen des Detergenz luftblasenfrei im Transferpuffer des Containers expandiert wird. Jeweils 4 bzw. 2 Lagen 3MM Chromatographiepapier werden in Transferpuffer getränkt. Das Gel wird mit der Oberseite nach unten auf die

Lagen mit feuchten Chromatographiepapieren gelegt und beim Aufbau eventuell auftretende Luftblasen zwischen den feuchten 3MM Chromatographiepapieren bzw. dem Gel und der Nylonmembran werden durch Ausrollen mit einer sauberen Glas- oder Plastikpipette entfernt. Um zu vermeiden, dass das Gel zusammengedrückt wird, sollte das Gewicht auf dem Blot ungefähr $0,5 \text{ g/cm}^2$ betragen.



Nach 1 Stunde ist der Transfer beendet. Die Membran wird anschließend 2 min in Neutralisationspuffer geschwenkt und 2 min getrocknet. Die RNA wird durch UV-Bestrahlung im UV-Stratalinker™ 2400 (2 min „autocrosslink“) an die Membran gekoppelt. Der Transfer kann nun an Hand der ethidiumbromid-gefärbten HeLa-Zell-RNA unter der UV-Lampe überprüft werden. Um Reste von Formaldehyd zu entfernen, trocknet die Membran ÜN bei RT. Während sie am nächsten Tag 2 x 10 min. mit 2x SSC + 0,5% SDS bei RT gewaschen wird, wird die Prehybridisierungslösung aufgekocht und danach auf 37-42°C abgekühlt. Dabei ist die Temperatur vor allem abhängig vom GC-Gehalt der DNA-Sonde und dem Homologiegrad zu ihrer RNA. Die Membran wird mind. 1 Stunde in 20 ml dieser Lösung bei dieser Temperatur im Schüttelwasserbad oder einem speziellen Hybridisierungssofen inkubiert. Parallel dazu werden 10-15 µl des Biotin-markierten DNA-Fragments in 500 µl Prehybridisierungslösung für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend direkt in den Kontainer mit Membran und Prehybridisierungslösung geben und ÜN bei 37-42°C im Schüttelwasserbad an die RNA hybridisiert.

Die Prehybridisierungslösung wie auch die Hybridisierungslösung kann mehrfach verwendet werden. Beide müssen vor jedem Gebrauch 10 min aufgekocht werden, um die enthaltene DNA zu denaturieren. Nachdem die Hybridisierung abgeschlossen ist, wird die Membran 2 x 10 min mit niedrig stringentem Waschpuffer bei RT geschwenkt, und anschließend mit vorgewärmtem (55-65°C) hoch stringentem Waschpuffer 30 min – 1 Stunde im Schüttelwasserbad bei 55-65°C gewaschen. Die Temperatur und die Zeit richten sich hier bei nach der erwünschten Stringenz des Waschschritts. Währenddessen wird die Blockierlösung frisch angesetzt und in der Mikrowelle auf 70°C erhitzt (45 sec, 500 W). Um das Casein („I-Block“, Tropix) zu lösen, wird die Suspension 10 min bei 55°C gerührt. Vor dem Gebrauch wird die leicht trübe Lösung auf RT abgekühlt, die Membran anschließend 2 x 5 min mit Blockierlösung gewaschen und dann weiter 20-30 min unter langsamem Schwenken blockiert. Im nächsten Schritt wird das Konjugat aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase (als kommerziell erhältliche Lösung im „Southern light“-kit (Tropix) in der Verdünnung 1:5000) zum Blockierlösung zugegeben und bindet während der 20 minütigen Inkubation bei RT an das Biotin der markierten DNA-Sonde. Anschließend wird die Membran noch 2 x mit Blockierlösung und 3 x mit 1x PBS + 0,5% SDS gewaschen bevor sie durch 2 maliges Schwenken in Detektionspuffer für die Entwicklung äquilibriert wird. Überschüssiger Detektionspuffer wird über ein feuchtes 3MM Chromatographiepapier abgezogen und die Membran mit der Oberseite nach unten auf vorgelegte Substratlösung (CPD-Star, Amersham) gegeben. Nach 5-10 min wird auch die Substratlösung über feuchtes Chromatographiepapier entfernt, und die Lichtemission über einen Lumineszenz-Film („Bio-Max“, Kodak) detektiert.

4.9.4.4 Entfernen des Konjugats aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase („Strippen“)

Möchte man eine RNA-Präparation in Hinsicht auf unterschiedlichen RNA-Moleküle untersuchen, so muß sowohl das Konjugat (Streptavidin/Alkalische Phosphatase) als auch die ursprüngliche DNA-Sonde entfernt werden. Die Membran wird zu erst auf dem Schüttler für 10 min in „Strip“-Puffer inkubiert und dabei die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin gelöst. Im zweiten Schritt wird die Bindung zwischen DNA-Sonde und RNA durch Inkubation mit 2x SSC + 0,5% SDS + 50% Formamid (10 min, RT) labilisiert, und ein Teil der ersten Sonde abgewaschen. Die Membran wird weitere 5 min mit 2x SSC + 0,5% SDS gewaschen, bevor sie wie schon unter 4.9.4.3 beschrieben in die vorher gekochte Prehybridisierungslösung gegeben und für 1 Stunde bei 37-42°C unter Schütteln inkubiert wird. Es folgt die Inkubation mit der neuen Hybridisierungslösung und die anschließende Detektion nach dem unter 4.9.4.3 beschriebenen Methode.

Wichtig zu bemerken ist in diesem Zusammenhang, dass die Entfernung der ersten DNA-Sonde auf keinen Fall vollständig ist, und dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muß.

4.10 Aufreinigung der in MVA infizierten Zellen synthetisierten Proteine

4.10.1 Aufreinigung rekombinanter MSP-1 Fragmente mittels Immunaффinitätschromatographie

Bei diesem Typ der Adsorptionschromatographie wird das aufzureinigende Protein hochspezifisch und reversibel von seinem Liganden, einem monoklonalen Antikörper, adsorbiert, der mit einer nichtlöslichen Matrix (Sephrose-Protein A) kovalent verbunden ist.

4.10.1.1 Vorbereitung der Immunaффinitätschromatographiesäule mit mAk 5.2

Für ein Säulenvolumen von 1 ml werden 1,5 ml Sepharose-Protein A Suspension entnommen und 2x mit NET-Puffer pH 7,4 gewaschen, indem die Suspension je 10 sec bei 4000 upm sedimentiert und anschließend in 500 µl NET-Puffer aufgenommen wird. Zur Bindung des monoklonalen Antikörpers 5.2 an diese Matrix wird die Sepharose-Protein A Suspension im folgenden für mindestens 1 Stunde unter ständigem Schütteln mit 50 ml Hybridoma Überstand inkubiert. Die Sepharose-Matrix mit dem gebundenen Antikörper wird für 5 min mit 1000 Upm in der Zellkulturzentrifuge sedimentiert, der Überstand bei 4°C aufbewahrt und kann mehrfach verwendet werden. Nach zweimaligem Waschen mit je 15 ml Na-Borat pH 9 wird das Sediment in Boraxpuffer resuspendiert und 20 mM DMP als Pulver zugegeben (entspricht 78 mg bei einem Volumen von 15 ml), das die kovalente Verknüpfung von Protein A mit den Antikörpermolekülen vermittelt. Nach 30 minütigem Schütteln bei RT wird die Matrix bei 1000 Upm für 5 min sedimentiert. Um die Kopplung zu überprüfen sollten vor und nach der Inkubation mit DMP Aliquots von je 150 µl (entspricht ca. 10 µl Sepharose-Protein A Matrix) entnommen und über SDS-PAGE analysiert werden. Danach wird das Sediment 1x mit 15 ml 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 gewaschen, sedimentiert, in 15 ml frischen 0,2 M Ethanolamin aufgenommen und 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Sedimentation und einmaligem Waschen mit 15 ml TNET, wird das Säulenmaterial in 10-15 ml TNET aufgenommen und in die Säule überführt. Das Material sollte fortan bei 4°C aufbewahrt werden.

4.10.1.2 Aufreinigung rekombinanter MSP-1 Fragmente aus Überständen MVA-infizierter Zellen mittels Immunaффinitätschromatographie

Die Immunaффinitätsmatrix mit mAk 5.2 wird mit mindestens 5 Bettvolumen TNET-Puffer äquilibriert. Anschließend läßt man den Überstand der infizierten Zellen bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min für mehrere Stunden (auch ÜN) bei 4°C über die Säule zirkulieren. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit 5 Säulenvolumen TNET-Puffer, gefolgt von 5 Säulenvolumen TNET+NaCl-Puffer und 2 Säulenvolumen NET, pH 6,8 ausgewaschen. Die Elution erfolgt durch 16 x 500 µl 0,1 M Glycin-Lösung, pH 2,5. Die Fraktionen werden sofort durch Sammeln in einem vorgelegten Volumen von 1M Tris, pH 8,0 (90 µl Tris/500µl Fraktion) neutralisiert und bei -80°C eingefroren. Vor der Lagerung wird die Säule mit mindestens 5 x Vol. TNET äquilibriert.

4.11 Immunisierungsstudien im Mausmodell

Um die Immunogenität des rekombinanten MSP-1-Fragments p42 zu untersuchen, wurden Immunisierungsstudien im Tiermodell durchgeführt. Das hier gewählte Mausmodell ist nicht durch die Anzahl der Versuchstiere limitiert, kann jedoch nicht für protektive Immunisierungsstudien verwendet werden. In diesem Tiermodell wurden zwei verschiedene Antigenpräparationen eingesetzt: Das aus E. coli gereinigte rekombinante p42 und rekombinante MVA als Trägerorganismus für das gleiche MSP-1-Fragment. Im Rahmen dieser Arbeit wurden BALB/c Mäuse für die Immunisierungsexperimente verwendet und sowohl mit ausschließlich einer Antigenpräparation immunisiert, als auch mit Kombinationen beider.

4.11.1 Immunisierung mit rekombinanten MVA

Für die Immunisierung der Mäuse wurden die hochkonzentrierten MVA-Stockpräparationen (Titer mindestens $7,5 \times 10^8$ IU/ml) direkt vor der Immunisierung aufgetaut und 1 x 1 min ultraschallt (Stärke 7, Puls 30%). Die Viruspension wird auf den gewünschten Titer in Tris/NaCl-Puffer verdünnt und den Mäusen anschließend je

1×10^6 bzw. 1×10^8 infektiösen Partikeln intraperitoneal (i.p.) injiziert, dabei sollte das Infektionsvolumen möglichst klein gehalten werden (200 μ l).

Für die erste Immunisierung werden die Mäuse mit 10^6 infektiösen Partikeln infiziert, dabei werden je 5 Mäuse mit rekombinanten Viren immunisiert, während die Kontrollgruppe die gleiche Dosis Wildtyp-MVA erhält. Die Immunisierungen werden zwei mal mit einer höheren Dosis an Viren (10^8 inf. Partikel) wiederholt. Die erste Wiederholung („1. Boost“) erfolgt 3 Wochen nach der Erstimmunisierung, die zweite Wiederholung (2. „Boost“) nach weiteren 3 Wochen. In dieser Arbeit wurde den Mäusen vor den Immunisierungen je 50 – 100 μ l Blut entnommen und zusätzlich 3 und 6 Wochen nach dem 2. „Boost“.

4.11.2 Immunisierung mit gereinigtem, rekombinantem Protein

Das zur Immunisierung verwendete MSP-1-Fragment p42 wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt. Das Fragment enthält zusätzlich zu den zu MSP-1 gehörenden Aminosäuren n-terminal 6 Histidine und wurde von Christian Epp im Labor über eine Ni^{2+} -Affinitätschromatographie und eine Gelfiltration aufgereinigt. Das Protein wurde anschließend in NaPh/NaCl-Puffer auf eine Konzentration von 0,5 μ g/ μ l verdünnt. Reine Proteine sind sehr wenig oder gar nicht immunogen und werden deshalb in Immunisierungsstudien häufig in einer Mischung mit einem Adjuvans verabreicht. Im Rahmen der hier besprochenen Maus-Immunisierungen werden die Proteinpräparationen mit der gleichen Menge Freund's Adjuvans (Sigma) gemischt. Zu diesem Zweck wird das Gemisch in eine sterile 2 ml Einmal-Plastikspritze aufgezogen und über ein dünnes Verbindungsrohrchen mit einer zweiten Spritze verbunden. Nun wird es so lang schnell zwischen den beiden Spritzen hin und her bewegt, bis eine homogene, relativ feste Emulsion entsteht (ca. 15 min).

Für die erste Immunisierung wird komplettes Freund's Adjuvans verwendet (FCA), für den ersten und zweiten „Boost“ unkomplettes Freund's Adjuvans (FIA). In der immunisierten Gruppe erhält jede Maus 5 μ g Protein subcutan (s.c.), während den Mäusen der Kontrollgruppe NaPh/NaCl-Puffer in Freund's Adjuvans injiziert wird. Das injizierte Volumen sollte in beiden Fällen 150 μ l nicht überschreiten.

4.12 Immunologische Methoden zur Analyse der Seren

4.12.1 „Immunoblot“-Analyse Plasmodium-infizierter Erythrozyten

Um die Reaktivität der Antikörper aus den Seren der immunisierten Mäuse nicht nur an Hand des rekombinanten Proteins zu testen, sondern auch die Bindung an natives MSP-1, werden „Immunoblot“-Analysen an *P. falciparum* infizierten Erythrozyten durchgeführt. Da ein hoher Anteil an Hämoglobin in der Präparation die Auftrennung der parasitären Proteine behindert, wird die Kultur wie folgt behandelt, bevor die Proteine wie unter 4.6.5 beschrieben mittels „Immunoblot“ analysiert werden können.

5 ml einer Kultur, die eine Parasitämie von 3 – 5% aufweist, werden 2 min mit 1900 Upm bei 4°C (Heraeuszentrifuge, eingeschalteter Bremse) im 15 ml Falcongefäß zentrifugiert. Der Überstand wird weitestgehend verworfen, und das Pellet in ca. 100 μ l Überstand, die auf Pellet verbleiben, resuspendiert. Anschließend wird es mit 250 μ l 1x PBS versetzt und in ein „Snapcup“ überführt. Zu dieser Suspension werden nun 10 Volumen (in Bezug auf Zellen + PBS) vorgekühlter Lysepuffer gegeben und 3 min auf Eis inkubiert. Die nachfolgende Zentrifugation (10 min, 10.000 Upm, 4°C, SM24-Rotor, Beckmannzentrifuge) liefert ein weißes, gelartiges Pellet, das noch ein mal in 5 ml Lysepuffer aufgenommen und wie oben behandelt wird. Nach der zweiten Zentrifugation wird das Pellet in 40–50 μ l 2x Protein-Probenauftragspuffer aufgenommen und 3 min bei 70°C erhitzt. 2–5 μ l werden nun über eine SDS-PAGE (siehe 4.6.2) aufgetrennt und anschließend über „Immunoblot“ (4.6.5) analysiert. Wahlweise kann auch ein größeres Volumen in einem präparativen Maßstab aufgetragen werden, um die Membran nach dem Proteintransfer in schmale Streifen zu schneiden, und damit unterschiedliche Seren in einem Auftrennungsansatz zu untersuchen.

4.12.2 IFA mit Plasmodium-infizierten Erythrozyten

Eine weitere Methode um die Kreuzreaktivität der Antikörpern aus den Seren der immunisierten Mäuse mit dem nativen MSP-1 zu untersuchen, ist die indirekte Immunfluoreszenz (siehe 4.9.3) an einer mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten-Kultur getestet. Die dazu notwendigen Präparationen von infizierten Erythrozyten, vorbereitet als ein Blutausschlag auf einem Objektträger, können über mehrere Wochen, geschützt vor dem Austrocknen mit Parafilm, bei 4°C gelagert werden. Die für diese Versuche verwendeten infizierten Erythrozyten-Kulturen wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Michael Lanzer bereitgestellt.

Zeigen die Erythrozyten-Kulturen eine Parasitämie von 3-5%, wird 1 ml der Kultur in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß 2 min mit 1600Upm bei RT in der Eppendorffzentrifuge pelletiert, das Pellet ein mal in 1x PBS gewaschen und anschließend in 20 μ l 1 x PBS resuspendiert. Je 2-5 μ l werden auf einem Objektträger mit Hilfe eines zweiten ausgestrichen und für wenigstens 15 min an der Luft bei RT getrocknet. Jeder Ausstrich kann für mehrere Proben gleichzeitig benutzt werden. Dazu werden mit Hilfe eines sog. "Pap Pen's", eine Art Klebstoffstift, mehrere Kreise auf dem Objektträger gezeichnet, die jeweils ein begrenztes Feld für minimale Mengen (20 μ l) von Inkubationslösungen darstellen. Die Zellen auf dem Objektträger werden 5 min mit

vorgekühltem Aceton (-20°C) fixiert und permeabilisiert, und anschließend 3 mal mit 1x PBS gewaschen. Während der weiteren Inkubationsschritte befinden sich die Proben in einer „Feuchtkammer“ (bestehend aus einer Plastikschaale mit mehreren Lagen von feuchten Papiertüchern, überdeckt mit Parafilm oder einem Deckel), um das Austrocknen der Proben zu vermeiden.

Die infizierte Kultur in den eingekreisten Flächen wird bei 37°C 15 min mit 1% BSA in 1x PBS blockiert, die Seren werden 1:50 in 0,5% BSA in 1x PBS verdünnt und nach dem Blockieren ebenfalls auf eingekreiste Fläche geben und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wird der zweite Antikörper (Cy3 konjugiertes anti-Maus IgG 1:500 in 0,5% BSA in 1x PBS) zugegeben, für 45 min bei 37°C inkubiert, und die Proben danach weitere 3 mal mit 1x PBS gewaschen. Um die Parasiten in den Erythrocyten zu lokalisieren, wird ihre DNA mittels DAPI angefärbt. Hierzu werden die Blutaussstriche zusätzlich für 15 min bei 37°C mit DAPI-Lösung im Dunkeln inkubiert und im Anschluß 3 x mit Wasser gewaschen. Danach werden die Objektträger getrocknet und wie auch unter 4.9.3 beschrieben mit „Moviol“ eingedeckt.

Schließlich wird die IFA unter dem konfocalen oder dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

4.12.3 “Enzyme linked immunosorbent Assay” (ELISA)

Die ELISA-Technik macht es möglich, die Sensitivität und die Spezifität der Bindung von Antikörpern an ihr Antigen zu erfassen und je nach Fragestellung kann sie zum Nachweis und zur Quantifizierung von Antigenen oder Antikörpern dienen.

Zuerst wird das Antigen auf einer festen Phase (Polystyrol) immobilisiert. Anschließende Inkubation mit den Seren, welche in einer Verdünnungsreihe angesetzt werden und die Antigen-spezifische Antikörper enthalten, ermöglicht die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Die gebundenen Antikörper werden von enzymatisch markiertem, sekundärem Antikörper erkannt (indirekter ELISA Test). Die Menge des gebundenen markierten Antikörpers bestimmt letztlich die Stärke des Signals.

Als Antigen wurden das rekombinante, aus *E. coli* gereinigten MSP-1 Fragmente p42 verwendet. Zum Beschichten der Polystyrol-Platten wurden das Protein in Karbonatpuffer auf die Konzentration von 1 µg/ml verdünnt, und die Platten mit je 100 µl Antigenlösung/Vertiefung beschichtet. Nach einer Inkubation bei 4°C UN ist das Antigen auf dem Polystyrolboden der Platten nicht-kovalent gebunden. Das nicht gebundene Antigen wird in zwei Waschsritten mit je 200 µl Waschpuffer (1xTBST) entfernt. Um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, werden die Platten mit 100 µl Blockpuffer (1% Magermilchpulver in TBS) pro Vertiefung bei RT für 1 h inkubiert. Anschließend werden die Platten erneut zwei mal mit TBST gewaschen und mit den Seren (in einer Verdünnungsreihe mit dem Blockpuffer) beschichtet. Die Verdünnungsreihe wird wie folgt direkt in den Platten angesetzt: in die erste Reihe werden je 200 µl der Ausgangsverdünnung vorgelegt, der Rest der Platte wird mit je 100 µl Blockpuffer beschichtet. Mit einer 12-Kanal-Pipette werden aus der ersten Reihe je 100 µl der Lösung herausgenommen und mit den 100 µl Lösung der darauf folgenden Reihe durch mehrmaliges Ab- und Aufpipettieren gemischt. So entsteht reihenweise eine 1:2 Verdünnung der Ausgangskonzentration der Serumantikörper. Ausgehend von einer 1:100 Verdünnung wird in der letzten Reihe der Platte die 1:12.800 Verdünnung erreicht. Die ersten beiden Spalte jeder Platte dient bei der Messung als Blindwert zur Äquilibrierung des Gerätes und werden deshalb nur mit Blockpuffer gefüllt. Auch von den einzelnen Seren werden je zwei Spalten angesetzt. Es folgt eine Inkubation UN bei 4°C. Am nächsten Tag werden die Platten viermal mit je 200 µl TBST je Vertiefung gewaschen und mit dem sekundären Antikörper beschichtet (1:7500 in Blockpuffer verdünnt). Hierbei handelt sich um ein Konjugat aus anti-Maus-IgG gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase. Nach einer Stunde bei RT werden die Platten zweimal mit TBST und zweimal mit Substratpuffer gewaschen (siehe oben). Die Farbreaktion wird katalysiert durch die Alkalische Phosphatase, die ihr Substrat p-Nitrophenylphosphat zu einem farbigen Endprodukt hydrolysiert. Das p-Nitrophenyl-phosphat wird zu diesem Zweck in einer Konzentration von 1 mg/ml im Substratpuffer gelöst und mit dem Ansatz für 1h bei RT und in Dunkelheit inkubiert (100 µl je Vertiefung). Die Reaktion wird durch Zugabe von je 100 µl 0,1M EDTA gestoppt, und die Intensität des Farbsignals bei 405 nm im ELISA-Gerät photometrisch bestimmt.

4.12.4 Invasionsinhibierung durch MVA-spezifische neutralisierende Antikörper

Titer MVA neutralisierender Antikörper im Serum immunisierter Tier werden durch 50 %ige Plaquereduktion ermittelt. Zu diesem Zweck werden die Seren 1:40 in PBS vorverdünnt und in 96-Loch-Platten mittels einer 12-Kanalpipette reihenweise wie folgt verdünnt: Ähnlich den Verdünnungsreihen der Seren im unter 4.12.3 beschriebenen ELISA, wird in Doppelansätzen je 200 µl der niedrigste Verdünnung vorgelegt, während die restlichen Vertiefungen mit 100 µl 1 x PBS gefüllt sind. Nun werden jeweils 100 µl in die jeweils nächste Vertiefung gegeben und mittels Auf- und Abpipettieren gemischt. Von dieser werden im folgenden ebenfalls 100 µl entnommen und mit den in der nächsten Vertiefung vorgelegten 100 µl 1 x PBS gemischt, und so weiter bis zu einer Verdünnung von 1:1280. Hier nun werden die entnommenen 100 µl verworfen. Im weiteren werden Wildtyp-MVA aufgetaut, einmal eine min ultrabeschallt (Stufe 7, Puls 30%) und in 1x PBS auf 5000 IU/ml verdünnt. Von dieser Virussuspension werden je 500 IU (100 µl) zu den Verdünnungen der Seren in den Vertiefungen der 96-Loch-Platten geben und durch Pipetteiern gemischt. Um eine Bindung der Antikörper an die Viren zu ermöglichen werden diese Platten nun 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die nachfolgende Infektion findet in 24-well-Platten statt, in denn zu 80% konfluente BHK21-Zellen wachsen. Zu den Zellen werden mit je 100 µl der MVA-Antikörper-Mischung gegeben und für eine Stunde im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Danach wird das Medium samt Viren und Serum entfernt, der

Monolayer ein mal mit 1x PBS gewaschen. Mit frischem Medium (DMEM + 2% FCS) überschichtet werden die Zellen 48 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

Nach der Inkubation wird das Medium abgesaugt, und die infizierten Zellen werden wie unter 4.9.2 beschrieben durch Immunperoxidase Färbung angefärbt. Als primärer Antikörper dient ein polyklonales Serum gegen Wildtyp-MVA aus Kaninchen in einer Verdünnung 1:1000 in 2%FCS in 1x PBS, als zweiter Antikörper anti-Kaninchen-IgG gekoppelt an das Enzym Peroxidase. So wird die Infektionsrate und damit die 50%ige Inhibition der MVA-Infektion durch das Zählen der gefärbten Zellen ermittelt. Hierbei dienen die 1:40 Verdünnungen der Pre-Immunsereen als Referenzwerte (100%).

Alternativ läßt sich die Infektionsrate auch über das Auszählen der durch die Infektion entstandenen Läsionen in der BHK21-Zellschicht ermitteln. Im Weiteren ist auch diese Methode mit CEF-Zellen durchführbar.

5. ERGEBNISSE

5.1 Konstruktion des *mSP1d* Gens

Durch den hohen A+T Gehalt des *P. falciparum*-Genoms ist es nicht möglich, längere DNA-Fragmente stabil in *E. coli* zu klonieren, bzw. zu propagieren. Wie schon für das *mSP1*-Gen des FCB-1-Stammes (*mSP1f*) gezeigt werden konnte, löst die Reduktion des A+T Gehalts von 74% auf 55% in Anlehnung an die humanen Kodonhäufigkeit dieses Problem und ermöglicht die Expression des *mSP1* in heterologen Expressionssystemen (Pan et al., 1999; Türbachova, Dissertation 2000).

Für die Synthese des zweiten *mSP1*-Prototyps aus dem MAD20-Stamm wurde die 1720 Aminosäuren lange Sequenz des *P. falciparum*-Isolates 3D7 gewählt und die entsprechenden DNA-Sequenz wie schon für *mSP1f* umgeschrieben. Einzelheiten zur Synthese finden sich in der Dissertation von I. Türbachova.

5.1.1 Konstruktion des *mSP1d* Gens aus einzelnen Fragmenten

Die synthetische *mSP1d* Sequenz wurde aus fünf, den natürlichen Prozessierungsprodukten entsprechenden Fragmenten (*mSP1d-83* bis *mSP1d-19*) zusammengesetzt. Jedes dieser einzelnen Fragmente enthält am 3'Ende zwei Terminationssignale und eine zusätzliche ClaI-Schnittstelle. Am 5'Ende erhielten alle Fragmente eine BamHI-Schnittstelle mit Ausnahme von *mSP1-83* und dem vollständigen Gen, welchen je eine MluI-Erkennungsstelle angefügt wurde. Diese Modifikationen ermöglichten die einheitliche Klonierung dieser Fragmente über die BamHI- und ClaI- bzw. MluI- und ClaI- Schnittstellen in den Klonierungsvektor pPfl (pBluescript mit einer modifizierten multiplen Klonierungsstelle, eine Restriktionskarte des Vektors findet sich im Anhang). Zusätzlich zu diesen Schnittstellen tragen alle Fragmente Restriktions-Erkennungssequenzen, über die sich die einzelnen Gen-Fragmente zusammengefügt ließen, ohne dass die Aminosäuresequenz verändert wurde. Über diese internen Schnittstellen wurden letztlich *mSP1d* zusammengesetzt.

Synthese von mSP1d-83

Nachdem die drei Fragmente des *mSP1d-83* einzeln in pPfl kloniert und anschließend durch Doppelsequenzierung verifiziert waren, wurde zuerst das Fragment II (618 bp) über seine Schnittstellen StyI und ClaI geschnitten, über Gelelektrophorese in 1% Agarose aufgetrennt und isoliert und an das Fragment I (730 bp) in pPfl fusioniert. Fragment II wurde mit Fragment III (816 bp) durch eine BsaI-Schnittstelle verbunden. Diese Restriktionsschnittstelle wurde zusammen mit der ClaI-Erkennungssequenz genutzt, um das p83-kodierenden DNA-Fragment in pPfl zusammenzufügen. Daraus resultierte das Plasmid pPfl/d-83-1. Die Fragmente I, II und III der p83-kodierende DNA-Sequenz wurden bereitgestellt von Weiqing Pan und Ivana Türbachova. Nach den Ligationen der Fragmente wurden die Fusionsstellen wiederum durch Sequenzierungen überprüft.

Synthese von msp1d-30

Das *msp1d-30*-Fragment wurde von Ch. Berberich synthetisiert, in pPf1 kloniert (pPf1/d-30) und sequenziert.

Synthese von msp1d-38

Das *msp1d-38*-Fragment (1239 bp) besteht aus zwei Teilfragmenten (I: 547 bp, II: 629 bp), die fehlerfrei von Ch. Berberich bereitgestellt und von I. Türbachova in pPf1 zusammengesetzt und verifiziert wurden (pPf1/d-38).

Synthese von msp1d-29

Die Synthese von *msp1d-29* liefert ein Fragment von 853 bp und wurde von I. Türbachova in pPf1 zusammengefügt und durch Sequenzierung überprüft (pPf1/d-29).

Synthese von msp1d-19

Das 341 bp lange Fragment von *msp1d-19* wurde von I. Türbachova synthetisiert, in pPf1 kloniert (pPf1/d-19-2) und anschließend sequenziert.

Synthese des msp1d Gens aus den einzelnen Fragmenten

Das Fragment *msp1d-42* wurde von C. Fernandez aus *msp1d-29* und *msp1d-19* zusammengesetzt. Sie nutzte dazu die Restriktionsschnittstelle SspI, die zwischen den beiden Teilen des *msp1d*-Gens liegt, und BamHI am 5'Ende von *msp1d-29*, um diese Fragmente anschließend in den ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pPf-1/d-19 zu ligieren. Daraus resultierte der Vektor pPf1/d-42-2.

Im zweiten Schritt wurde *msp1d-38* mittels BamHI – BstEII aus pPf1/d-38 isoliert und über diese Restriktionsschnittstellen in pPf1/d-42-2 eingesetzt, wodurch pPf1/d-38/42-2 entstand (C. Fernandez).

Parallel wurden die Fragmente *msp1d-30* und *msp1d-83* zusammengefügt. Zu diesem Zweck wurde pPf1/d-30 mit ClaI und EaeI geschnitten, die resultierenden Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und *msp1d-30* (584 bp) anschließend isoliert. Analog wurde *msp1d-83* (2164 bp) über EaeI und MluI aus pPf1/d-83-1 isoliert und beide Fragmente im Anschluss über die Schnittstellen MluI und ClaI in pPf1 zusammengefügt. Auch der Vektor pPf1 trägt vier Erkennungssequenzen für EaeI, daher musste das Plasmid mit der Fusion aus *msp1d-83* und *msp1d-30* aus drei DNA-Fragmenten zusammengesetzt werden. Auch hier wurden die Fusionsstellen durch anschließende Sequenzierung auf mögliche Fehler hin untersucht. Der entstandene Vektor wurde pPf1/d-83/30-1 genannt.

Im letzten Schritt der *msp1d*-Gensynthese wurden die Fragmente *msp1d-83/30* und *msp1d-38/42* in pPf1 zusammengefügt. Zu diesem Zweck wurden die beiden Ausgangsvektoren (pPf1/d-83/30-1 und pPf1/d-38/42-2) mit AatII und SacI geschnitten. Dabei wurde im Fall von pPf1/d-83/30-1 ein Fragment der Größe 2768 bp über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und isoliert. Dieses Fragment trägt sowohl die Sequenz von *msp1d-83/30* als auch einen Teil des Vektors pPf1. Der Verdau von pPf1/d-38/42-2 mit den genannten Enzymen lieferte ein Fragment von 5329 bp, das sowohl *msp1d-38/42* trägt als auch den Großteil von pPf1. Beide Fragmente fusioniert lieferten das Plasmid pPf1/d-190-1,2,

welches das gesamte *msp1d* mit der authentischen Signal- und GPI-Ankersequenz trägt. Der Übergang der beiden Ausgangsfragmente wurde durch Sequenzierung verifiziert.

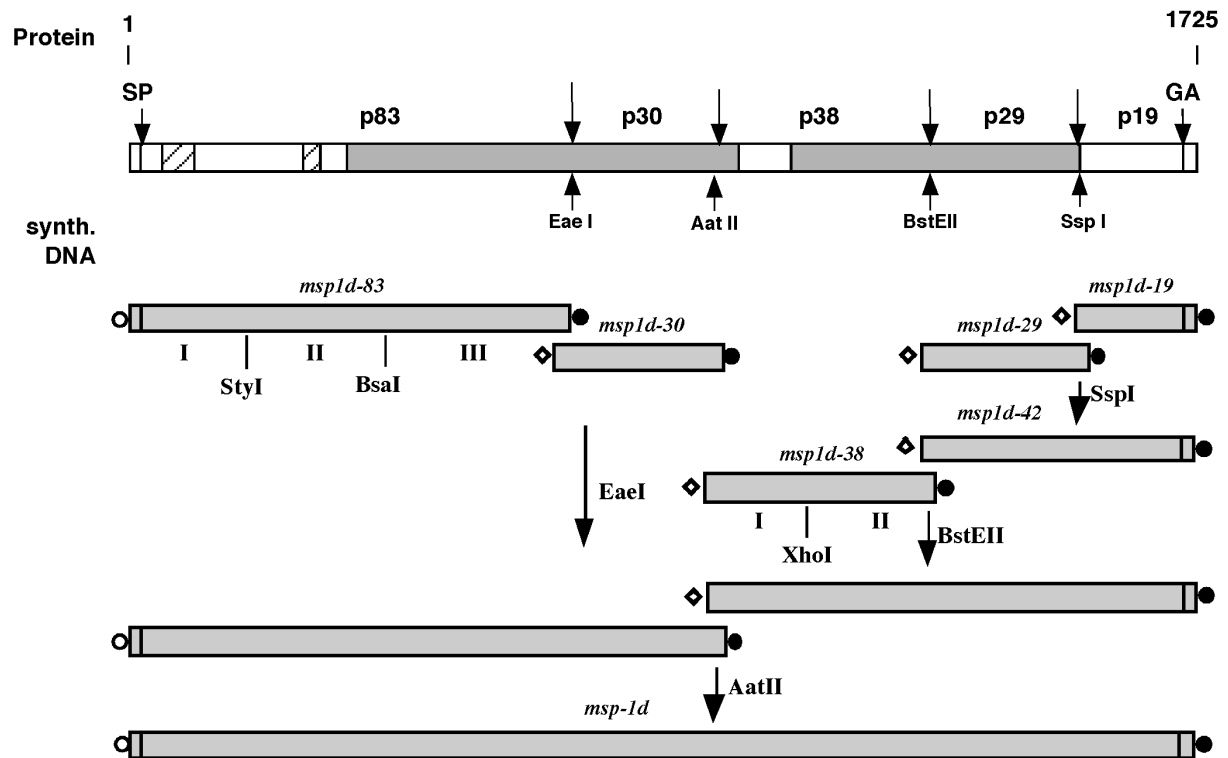


Abb. 5.1: Klonierungsstrategie für die Zusammensetzung des *msp1d* Gens aus einzelnen Fragmenten

Ausgehend von fünf Fragmenten, die den natürlichen Prozessierungsprodukten entsprechen, wurde *msp1d* über interne Schnittstellen zusammengesetzt, die jeweils nur einmal in der Sequenz vorkommen und die Aminosäuresequenz nicht verändern (EaeI, AatII, BstEII, SspI). Dabei setzt sich *msp1d-83* wiederum aus drei Fragmenten (*msp1d-83* I-III, verbunden durch StyI und BsaI) und *msp1d-38* aus zwei Teilstücken zusammen (über XhoI). Außerhalb des offenen Leserasters der jeweiligen Fragmente wurde folgende Modifikationen vorgenommen: das 5' Ende des *msp1d-83* besitzt eine MluI-Erkennungssequenz (♻) vor dem Initiationskodon, während alle weiteren Fragmente mit einer Schnittstelle für BamHI (✱) versehen wurden. Die 3' Enden aller Fragmente erhielten zwei Stoppkodons, gefolgt von einer ClaI-Schnittstelle (⌘). Die nach unten zeigenden Pfeile markieren die Positionen der Restriktionsendonukleaseschnittstellen, die für die Fusion der einzelnen Fragmente zum *msp1d*-Gen in seiner gesamten Länge verwendet wurden.

Die das Signalpeptid kodierende Sequenz gehört dem *msp1d-83*-Fragment an, während das GPI-Ankersignal von *msp1d-19* kodiert wird.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Nomenklatur sämtlicher Plasmide und Modifikationen von *msp1* und der *msp1*-Fragmente im Anhang erläutert werden.

5.2 Konstruktion von MSP1 Expressionsvektoren

5.2.1 Modifikation der C- und N-terminalen Bereiche von MSP1

Damit MSP1 zur Plasmamembran des Parasiten gelangt, sind zwei Signalsequenzen notwendig, die den Transport durch das Zytoplasma und die anschließende Verankerung des Proteins auf der Oberfläche vermitteln: einerseits das N-terminale, aus 19 Aminosäuren bestehende Signalpeptid, zum anderen die C-terminale, aus 18 Aminosäuren bestehende GPI-Anker-Signalsequenz. Beide Signale werden auch durch die synthetischen *msp1* Sequenzen kodiert (Pan et al., 1999).

Da die Transportsignale aus *P. falciparum* in Prokaryoten und Eukaryoten keine funktionelle Aufgabe übernehmen bzw. nicht korrekt prozessiert werden, wurden diese Sequenzen vor Expression von MSP1 in *E. coli* und Säugerzellen aus der synthetischen Sequenz entfernt.

Zu diesem Zweck wurden sowohl der C-terminale Bereich als auch der N-terminale Teil des synthetischen Gens modifiziert, die *P. falciparum*-Signale entfernt und zum Teil neue Restriktionsschnittstellen eingefügt, die eine Insertion alternativer Sequenzen ermöglicht.

Die dem C-terminale Fragment p19 entsprechende DNA-Sequenz beider *msp1*-Varianten wurde mittels PCR nach der unter 4.5.5 beschriebenen Methode amplifiziert. Dabei hybridisierten die jeweiligen „Antisense-Primer“ (K1-p19-anti bzw. 3D7-p19-anti) stromaufwärts der GPI-Anker-Sequenz. Diese Primer tragen an ihrem 5'Ende zusätzlich eine Erkennungsstelle für AclI, gefolgt von zwei Stopkodons und einer Schnittstelle für ClaI. Die „Sense-Primer“ (K1-p19-sense bzw. 3D7-p19-sense) hybridisieren über den Erkennungssequenzen für die Fusion von *msp1d-19* und *msp1d-29*. Im Falle der *msp1*-Sequenz des FCB-1-Stammes enthält die Sequenz die Erkennungssequenz für SphI, für die Sequenz, die für MSP1 aus 3D7 kodiert, handelt es sich um eine SspI-Erkennungssequenz. Beiden Restriktionsschnittstellen geht in den „Primern“ eine BamHI-Schnittstelle am 5'Ende voraus. Als Matrize für die PCR diente für die Modifikation der 3D7-Sequenz das Plasmid pPf1/d-p19-2 und im Falle des FCB-1-Stammes pPf1/f-190. Nach der PCR nutzte man die Bildung von stumpfen Enden („blunt ends“) durch die Pwo-DNA-Polymerase: Das Fragment wird in ein durch EcoRV linearisiertes pBluescript-Plasmid (pSK⁺) kloniert. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass das PCR-Produkt kein 5'Phosphat trägt. Daher darf das linearisierte Plasmid keinesfalls dephosphoryliert werden. Andererseits bietet dieser Umstand den Vorteil, dass ein sehr großer molarer Überschuss an PCR-Produkt in den Ligationsansatz gegeben werden kann, ohne dass es zu Mehrfachinsertionen des PCR-Amplifikats kommt. Im Weiteren bietet pBluescript die Möglichkeit, über eine so genannte „Blau-Weiß-Selektion“ gezielt nach solchen Plasmiden zu suchen, die das gewünschte DNA-Fragment integriert haben. Positive Klone wurden sequenziert, und die p19* (*= zusätzliche AclI-Erkennungssequenz) entsprechenden DNA-Fragmente später über die Schnittstellen für BamHI und ClaI in Expressionsvektoren eingefügt oder über SspI (3D7) bzw. SphI (K1) und ClaI-Schnittstellen an das p29-kodierende DNA-Fragment der jeweiligen *msp1* Varianten ligiert.

Auch die Sekretionssignalsequenzen aus *P. falciparum* wurden entfernt. Da die N-terminalen Bereiche (Block 1 nach Tanabe et al., 1987) beider MSP1-Prototypen in Bezug auf die Aminosäuresequenz gleich sind, wurden die Signalsequenz und weitere 40 Nukleotide der synthetischen *msp1*-Sequenz des 3D7-Isolats gegen die 40 N-terminalen Nukleotide der synthetischen Sequenz des FCB-1-Stamms ausgetauscht, dessen Signalsequenz entfernt worden war (Dissertation I. Türbachova 2000). Dies war möglich, da beide Sequenzen an der gleichen Stelle eine HindIII-Erkennungssequenz tragen. Die Konstrukte pPf1/f-190 und pPf1/d-83-1 wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und ScaI geschnitten, und ein 1184 bp langes DNA-Fragment aus Ersterem und ein 3877 bp umfassendes Fragment aus dem zweiten Plasmid isoliert und ligiert. Das resultierende Plasmid heißt pPf1/d-83 und wurde im Weiteren zur Konstruktion von pPf1/d-83/30 und pPf1/d-190 verwendet.

5.2.2 Vektoren zur Expression von MSP1 in Prokaryoten

5.2.2.1 Vektoren zur Expression von MSP1 in *E. coli*

Als Grundlage zur Expression von MSP1 in *E. coli* im Rahmen dieser Arbeit dienten Vektoren der pZ-Reihe (Lutz and Bujard, 1997). Die Transkription des *msp1*-Gens in den hier verwandten Vektoren wird kontrolliert durch den Promotor $P_{\text{LtetO-1}}$, d. h. das Gen wird nach Zugabe von Anhydrotetrazyklin abgelesen.

Ausgehend von den Vektoren pZE21mcs1, pZE22mcs2 und pDS56mod. wurde das Plasmid pZE21mcs.pf (im weiteren pZE21/H genannt) über Fragmente mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme BssHII, HindIII und EcoRI generiert. Der Vektor enthält neben einer modifizierten multiplen Klonierungsstelle auch eine Sequenz, die für die N-terminale Fusion von sechs Histidinen an MSP1 kodiert (beides aus pDS56mod.), was eine spätere Reinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglichte. Die zu dieser Klonierung genutzte HindIII-Erkennungsstelle wurde in einem weiteren Schritt zerstört, indem das Plasmid mit HindIII linearisiert, die überstehenden 5'-DNA-Einzelstränge mittels T4-Polymerase aufgefüllt und der resultierende Vektor religiert wurde. Dieser Schritt war notwendig, da auch *msp1* eine HindIII-Erkennungssequenz besitzt, die für weitere Klonierungsschritte von Bedeutung war. In diesen Vektor wurden *msp1d* bzw. Fragmente des Gens ausgehend von pPf1/d-*msp1* über die Erkennungssequenzen für BamHI und ClaI eingesetzt.

Die *msp1* tragenden Expressionsvektoren wurden in die Tet-Repressor exprimierende Bakterienzelllinie *E. coli* DH5 α -Z1 transformiert. Ausgehend von Einzelkolonien wurden Flüssigkulturen angesetzt, unter Schütteln bei 37°C bis zur frühen log-Phase hochgewachsen und mit Anhydrotetrazyklin für 3 h induziert (100 ng/ml). Die Zellen wurden zentrifugiert und das Sediment über SDS-PAGE (4.6.2) und über Immunoblot (4.6.5) analysiert.

Das Gesamtprotein wie auch die Fragmente p83, p83/30 und p38/42 wurden als Fusionen an sechs Histidine in *E. coli* hergestellt und über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 5.2 A). Die MSP1-Fragmente, welche die sechs N-terminalen Histidinreste tragen, werden im weiteren durch „H“ gekennzeichnet (z.B. MSP1D-H42). Das Gesamtprotein zeigt zusätzlich

zu der, bei ca. 190 kDa erwarteten Bande, Banden zwischen 100 und 180 kDa. Auch p83 und die N-terminale Fusion aus p83 und p30 zeigen Banden bei ca 50 kDa, die in den nicht induzierten Extrakt nicht auftreten. Möglicherweise handelt es sich hier bei um Degradationsprodukte oder unvollständig synthetisierte Proteine.

msp1d-42 wie auch *msp1d-19* wurden in geringeren Mengen translatiert und konnten erst durch Immunoblot-Analyse mit mAk 5.2 nachgewiesen werden (Abb. 5.2 B und Abb. 5.4). MSP1D-H42 wird in zwei eng bei einander laufenden Banden aufgetrennt, und auch die Fusion aus p38 und p42 liefert in der Immunoblot-Analyse zwei Signale, die im Laufverhalten Proteinen von ca. 75 kDa und 100 kDa entsprechen. Diese Beobachtungen lassen sich zum einen durch unterschiedliche Konformationen mit veränderter Mobilität erklären, sind im Fall von p38/42 möglicherweise jedoch auch auf sehr kompakt gefaltete Dimere zurückzuführen. Bei der Analyse von *E. coli*-Zellextrakten nach der Expression von *msp1d* in seiner gesamten Länge werden zahlreiche Banden zwischen 75 und 180 kDa angefärbt. Dabei handelt es sich um N-terminal verkürzte Teile von MSP1D, da mAk 5.2 den C-terminalen Bereich erkennt.

Auch *msp1d-30* und *msp1d-38* wurden unter Kontrolle von $P_{\text{LetO-1}}$ exprimiert, konnten jedoch durch Coomassie-Färbung nicht nachgewiesen werden. Die beiden Fragmente wurden später durch Christian Epp, Rolf Lutz und Christian Kauth u.a. als Fusionen an sechs N-terminale Histidinreste und eine Faktor-X-Schnittstelle in den Vektoren pZE13 unter Kontrolle von P_{A1LacO1} in guter Ausbeute synthetisiert.

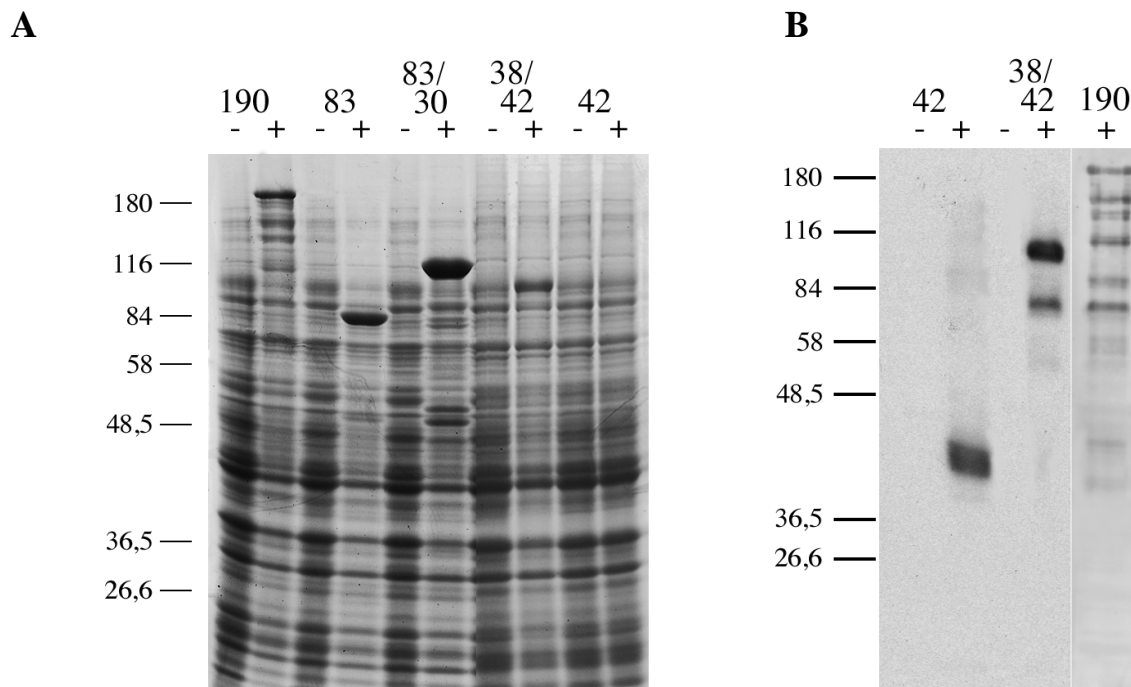


Abb. 5.2: Expression von *msp1d* in *E. coli* DH5 α -Z1

E. coli DH5 α -Z1 wurden mit *msp1d* tragenden Expressionsvektoren transformiert, bis zu frühen log-Phase hochgewachsen, bevor die Synthese der MSP1D-Fragmente durch Zugabe von Anhydrotetracyclin 3 h induziert wurde. Anschließend wurden die Gesamtzellextrakte über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt.

A zeigt eine Coomassiefärbung der Expression der MSP1D-Fragmenten bzw. des Gesamtproteins als Fusionen an sechs N-terminale Histidin-Reste. Aufgetragen wurden jeweils die nichtinduzierte (-) und die induzierte (+) Fraktion.

B: Die Gesamtzellextrakte der *E. coli* DH5 α -Z1, welche den C-terminalen Bereiche von MSP1D und das Gesamtlänge-MSP1D synthetisierten, wurden unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und über Immunoblot mit mAk 5.2 als Erst- und AP-konjugiertes anti-Maus-IgG als Zweitantikörper analysiert.

Um auch die Expression von *msp1* und seinen Fragmenten ohne zusätzliche sechs Histidine zu ermöglichen, wurde das Plasmid pZE21/*ompA* (die Konstruktion dieses Vektors wird später beschrieben) mit EcoRI und BamHI geschnitten und dadurch die *ompA*-Signalsequenz und die ribosomale Bindungsstelle entfernt. An ihrer Stelle wurde über die genannten Schnittstellen ein 36 bp DNA-Fragment eingefügt, das lediglich eine neue ribosomale Bindungsstelle und das Translationsinitiationskodon ATG trägt. Dieses Fragment wurde über zwei jeweils 31 bp lange Oligonukleotide („*ompA*-remove-sense“ und „*ompA*-remove-anti“) generiert, die nach der Reinigung über eine denaturierende PAA-Gelelektrophorese langsam hybridisierten und dabei ein Fragment mit zu den Schnittstellen passenden einzelsträngigen DNA-Überhängen bildeten. Dazu wurden sie im gleichen molaren Verhältnis in 0,1x TE-Puffer gemischt, kurz aufgeköcht und anschließend im Wasserbad über Nacht langsam abgekühlt. Das entstandene Fragment wurde ebenfalls über PAA-Gelelektrophorese von nicht hybridisierten Oligonukleotiden getrennt und anschließend in das geschnittene pZE21/*ompA* ligiert.

5.2.2.2 Konstruktion von Vektoren zur Expression von *msp1d* in „L-Form-Zellen“

Die Expression heterologer Proteine in *E. coli* in großen Mengen führt zum Teil dazu, dass diese Proteine in so genannten „Inclusionbodies“ als denaturierte Aggregate vorliegen. Das Auftreten dieser unlöslichen Proteinaggregate hat seinen Ursprung unter anderem in einer hohen Expressionsrate der Fremdproteine und deren damit verbundenen Akkumulation im Zytoplasma. Um das zu verhindern, wurde MSP1 im Rahmen einer Kollaboration mit Dr. Marian Kujau am Institut für Molekulare Biotechnologie (IMB) in Jena in so genannten „L-Form-Zellen“ exprimiert. Diese Bakterienzellen haben durch lange Selektion über Penicillin die Fähigkeit verloren, ihre Zellwand auszubilden, und besitzen somit auch kein Periplasma (Gumpert and Taubeneck, 1983). Fügt man nun ein prokaryotisches Sekretionssignal an das zu exprimierende Gen, so wird das resultierende Protein in das Medium exportiert und kann dort in löslicher Form isoliert werden.

Um MSP1 bzw. die Fragmente in diesem System herzustellen, wurde an das 5' Ende des Gens die 72 bp lange Sekretionssequenz aus dem *E. coli*-Protein *ompA* angefügt. Zu diesem Zweck wurden zwei Oligonukleotide („*ompA* sense“ 66 Nukleotide, „*ompA* anti“ 64 Nukleotide) entworfen, die im mittleren Bereich über 18 bp komplementär sind. Sie wurden gereinigt, in äquimolaren Mengen gemischt und nach der Hybridisierung die einzelsträngigen DNA-Abschnitte durch Pwo-DNA-Polymerase aufgefüllt. Die Synthese wurde nach folgendem Schema durchgeführt: Die Oligonukleotide wurden für 1 min bei 94°C denaturiert, dann 1

min bei 60°C hybridisiert und die überstehenden DNA-Einzelstränge für eine Minute aufgefüllt. Dieser Zyklus wurde fünf mal wiederholt und gefolgt von weiteren 5 min Elongation bei 72°C. Das resultierende 112 bp lange Fragment wurde über PAA-Gelelektrophorese gereinigt und in pSK⁺ eingesetzt (Methode siehe 5.2.1). Um eventuell auftretende Fehler in der Nukleotidsynthese auszuschließen, wurde das entstandene Plasmid in diesem Bereich sequenziert. Schließlich wurde das synthetisierte DNA-Fragment, das vor der ompA-Signalsequenz auch eine ribosomale Bindestelle trägt, über die Schnittstellen für EcoRI und BamHI in pZE21 eingesetzt. Über die Erkennungssequenzen für BamHI und ClaI wurden in diesen Vektor (pZE21/ompA) *mspI* bzw. Fragmente beider Prototypen eingesetzt und durch Dr. M. Kujau in L-Form *Proteus mirabilis* exprimiert. Um auch bei L-Form exprimiertem *mspI* die Möglichkeit der Reinigung über Nickel-Chelat-Chromatographie beizubehalten, wurde ein weiteres synthetisches DNA-Fragment eingefügt. Das bestand aus einem 32 bp langem DNA-Doppelstrang, der für sechs Histidine kodiert und dessen Enden jeweils einen GATC-Überhang aufwies. Diese Überhänge ermöglichten es, das Fragment direkt in das mit BamHI linearisierte Plasmid einzufügen, wobei die BamHI-Erkennungssequenz nur an der Fusionsstelle der Histidin-kodierenden Sequenz zu der *mspI*-Sequenz erhalten blieb. Dieser Doppelstrang wurde aus zwei synthetischen Oligonukleotiden generiert, die wie schon für die Entfernung der 6-Histidin-Sequenz aus pZE21mod beschrieben, gereinigt, hybridisiert und wieder gereinigt wurden. Im Weiteren wurde das linearisierte Plasmid durch das Enzym alkalische Phosphatase dephosphoryliert und das 36 bp DNA-Fragment mittels Polynukleotidkinase an seinen 5'Enden phosphoryliert, um einen hohen Anteil an religierten Vektoren in der folgenden Ligationsreaktion zu vermeiden.

Alternativ können MSP1 bzw. Fragmente auch in der Plasmamembran der L-Form-Zellen verankert werden. Dies bietet die Möglichkeit, neben den rekombinanten Proteinen selbst auch subzelluläre Membranvesikel, auf denen das Protein verankert ist, als Impfstoff einzusetzen. Zu diesem Zweck wurde eine hydrophobe Ankersequenz bestehend aus 15 Leucinen, gefolgt von fünf positiv geladenen Aminosäuren (KRKRY), entworfen, die das Protein in der Plasmamembran verankert. Bei diesem Entwurf ist zu beachten, dass sich keine positiv geladenen Aminosäuren direkt vor dem Polyleucin-Anker befinden, dies würde unter Umständen zu einer falsch orientierten Insertion des Proteins führen (Chen and Kendall, 1995). Die Stoptransfer-Sequenz wurde analog der Insertion der 6-Histin-Sequenz in pZE21/ompA über zwei je 66 Basen lange Oligonukleotide („Stoptransfer-sense“ und „Stoptransfer-anti“) synthetisiert und Phosphatgruppen an die 5'Enden des DNA-Doppelstrangs angefügt. Das Fragment trug an beiden Enden des Doppelstrangs einen CG-Überhang und wurde direkt in mit AclI linearisiertes und dephosphoryliertes pZE21/d-19*-7 eingesetzt. Ausgehend von diesem Konstrukt wurden weitere ompAsig.-*mspI*-Stoptransfer-Chimäre über die Schnittstellen AclI und BamHI kloniert und von Dr. M. Kujau exprimiert. Eine vollständige Liste der Konstrukte findet sich im Anhang .

In Abbildung 5.4 ist exemplarisch die Expression verschiedener *mspId-19*-Fusionen dargestellt. Die ompA-Signalsequenz, die sowohl an MSP1D-19 wie auch an MSP1D-H19 fusioniert wurde, führte wie zu erkennen an den beiden MSP1D-H19, zu keiner Änderung in der Laufhöhe (Spur 2 und Spur 6). Das kann durch das prostrtranslationale Entfernen der Signalsequenz erklärt werden. Die zusätzliche, hydrophobe Ankersequenz bewirkt ein zu

höherem Molekulargewicht verschobenes Laufverhalten von p19 (Spur 8). Im Fall der sekretierten Fragmente wird jeweils eine Doppelbande bei ca. 15 kDa und eine weitere Doppelbande bei 20 bis 24 kDa detektiert. Wie aus der Literatur bekannt (Stowers et al., 2001), kann p19 bei der heterologen Expression in Hefe unterschiedliche Konformationen annehmen, die zu unterschiedlicher Mobilität in der SDS-PAGE führen. Das könnte auch bei der Herstellung des Fragments in *E. coli* eine Rolle spielen.

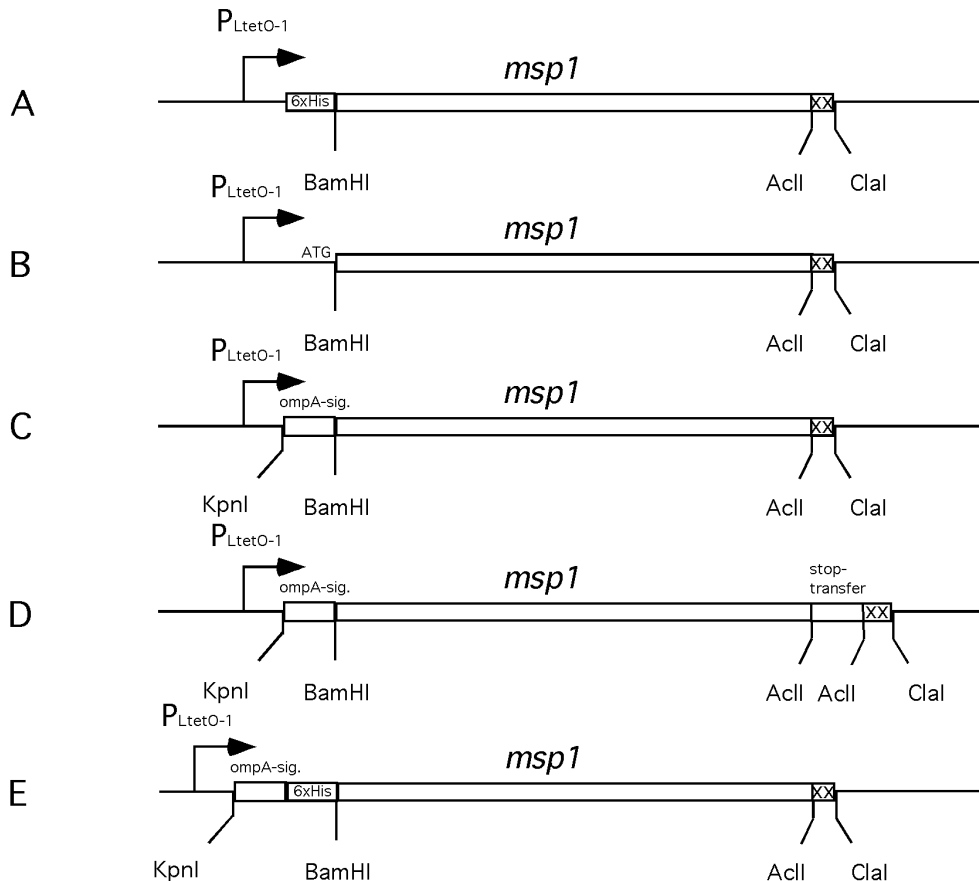


Abb. 5.3: Zusammenfassung der Genfusionen zur Expression von *msp1* in Pokaryoten

Dargestellt sind die unterschiedlichen Expressionseinheiten zur Herstellung von verschiedenen MSP1-Fusionsproteinen. In jedem Fall steht die Transkription unter Kontrolle des tetrazyklinabhängigen Promotors $P_{LtetO-1}$. Die Proteine unterscheiden sich zum einen durch Fusion von sechs Histidin-Resten an den N-Terminus der MSP1-Fragmente (**A** entspricht den Vektoren pZE21/d;f-H(*msp1*), **E** = pZE21/d;f-H(*msp1*)-7), und zum anderen in der Lokalisation der Proteine nach der Expression: Bei **A** und **B** (= pZE21/d;f-(*msp1*)) liegt MSP1 nach der Synthese im Cytoplasma der Bakterien vor, **C** (= pZE21/d;f-(*msp1*)-7) und **E** tragen die N-terminale Signalsequenz des *E. coli*-Proteins ompA, die zur Sekretion der heterolog hergestellten Proteine führt. Die zusätzlich angefügt Stoptransfersequenz in **D** (= pZE21(d;f-(*msp1*)-7,8) führt zur Verankerung der Proteine in der Plasmamembran der Bakterienzellen.

Die angegebenen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme BamHI und ClaI ermöglichen den Austausch der verschiedenen *msp1*-Fragmente, während die Kombination von KpnI und BamHI den Austausch gegen alternative Sekretions- oder auch Fusionssequenzen zulässt. Modifikationen des C-Terminus können über AclI und ClaI vorgenommen werden, zwischen denen 2 Stoppcodons kodiert sind (XX).

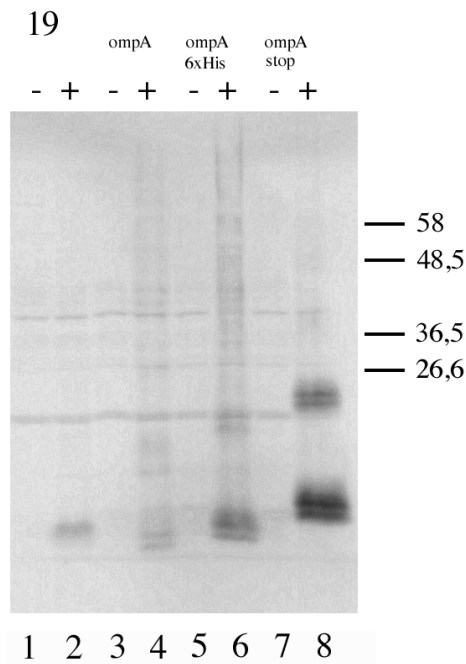


Abb. 5.4: Expression verschiedener *msp1d*-19-Fusionen

DH5 α -Z1 *E. coli* wurden mit Expressionvektoren zur Herstellung verschiedener MSP1D-19-Fusionsproteine transformiert, bis zur frühen log-Phase hochgewachsen und die Synthese von p19 über die Zugabe von Anhydrotetracyclin induziert. Die Gesamtzellextrakte wurden über 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt, und im anschließenden Immunoblot durch mAk 5.2 als ersten Antikörper nachgewiesen. In allen Fällen wurden jeweils die nichtinduzierte (-) und die induzierte (+) Bakterienfraktion aufgetragen. In den beiden ersten Bahnen wurde der Extrakt von Bakterien aufgetrennt, die mit pZE21/d-H19 transfiziert wurden (entspricht A in Abb. 5.3). In diesem Fall wird p19 als N-terminale Fusion an sechs Histidin-Reste cytoplasmatisch synthetisiert. p19 in den Bahnen 3 und 4 entspricht C in Abb. 5.3 und führt zur Sekretion des Proteins in das Periplasma von *E. coli*. Das in Bahn 6 erkannte p19 trägt N-terminal sechs Histidine und wurde ebenfalls ins Periplasma exportiert (entspricht Abb. 5.3.: E). p19 in der Bahn 8 trägt zusätzlich zur Signalsequenz die hydrophobe Stoptransfersequenz, die zur Verankerung des MSP1D-Fragments in der Plasmamembran führt (entspricht Abb.: 5.3: D).

Zur Analyse des in „L-Form“ *Proteus mirabilis* hergestellten MSP1F wurden Immunoblot-Analysen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (freundlicherweise bereitgestellt durch Dr. J. McBride) durchgeführt.

Im Vorfeld wurden diese Antikörper auf ihre Reaktivität in Bezug auf natives MSP1F getestet und anschließend heterolog hergestelltes, konzentriertes MSP1F aus dem Medium der „L-Form“-Bakterien analysiert (freundlicherweise bereitgestellt von Dr. M. Kujau).

In der Immunoblot-Analyse in Abbildung 5.5 wurde bei der Inkubation mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern nur das über Immunaффinitäts-Chromatographie angereicherte Gesamt-MSP1F aus dem Überstand der Bakterienzellen nachgewiesen. Das Protein zeigt keine N-terminale Degradation (mAb 5.2, 2.2, 7.3, 7.6 und 17.1 erkennen den C-Terminus von MSP1F und binden daher auch N-terminal verkürzte Fragmente). Mögliche C-terminal verkürzte Fragmente wurden auf Grund der Konzentration durch Bindung an mAb 5.2. nicht erfasst.

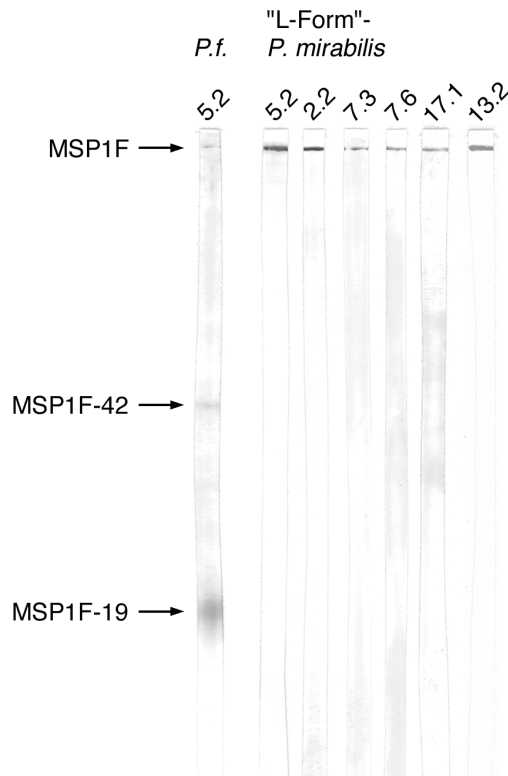


Abb. 5.5: Immunreaktivität von MSP1F aus L-form *Proteus mirabilis*

MSP1F aus dem Überstand von L-form *Proteus mirabilis* wurde unter nichtreduzierenden Bedingungen über SDS-PAGE aufgetrennt und sechs Streifen der Membran einer Immunoblot-Analyse mit je einem anderen monoklonalen Antikörpern unterworfen, die unterschiedliche Bereich von MSP1F erkennen (die monoklonalen Antikörper sind jeweils durch Nummern über den Streifen angegeben). Der erste Streifen zeigt natives MSP1F isoliert aus *P. falciparum* nachgewiesen mit mAb 5.2. Die obere Bande zeigt Gesamt-MSP1F. Die beiden unteren Banden zeigen die natürlichen Prozessierungsprodukte p42 und p19.

5.3 Herstellung rekombinanter MVA zur Expression von *msp1*

Durch die chemische Synthese der Sequenzen der beiden *msp1*-Prototypen wird es möglich, sowohl das Protein in seiner gesamten Länge als auch die einzelnen Fragmente in heterologen Expressionssystemen, z. B. *E. coli*, Säugerzellen oder *Toxoplasma gondii* herzustellen, und die so gewonnenen Proteine, wie auch die rekombinanten Organismen an sich als Impfstoff einzusetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Kollaboration mit Dr. Gerd Sutter an der GSF in München rekombinante MVA als weiteres System zur Expression von *msp1* etabliert und charakterisiert, um in Folge als Impfstoff eingesetzt zu werden. Als Ausgangspunkt dienten hier das Gen des Prototyps MAD20 in seiner Gesamtlänge und die den C-terminalen Fragmenten entsprechenden *msp1d-42* und *msp1d-38/42*. In einem ersten Schritt wurde die Immunogenität der rekombinanten Viren allein und in Kombination mit rekombinantem Protein aus *E. coli* im Mausmodell bestimmt.

5.3.1 Herstellung von Vektoren zur Integration von *msp1* Sequenzen in das MVA-Genom

Als Grundlage zur Herstellung von *msp1d*-rekombinanten MVA diene das Plasmid pIII_dHR.ssP (freundlicherweise bereitgestellt durch Dr. Gerd Sutter). In diesem Vektor steht das *msp1d* Gen unter Kontrolle eines synthetischen Vaccinia-Virus-spezifischen Promotors P_{ssp}, der die Expression heterologer Gene sowohl in der frühen als auch in der späten Transkriptionsphase ermöglicht. Als Marker für die spätere Selektion der rekombinanten Viren dient in diesem System das Gen *k11*. Das entsprechende Protein ermöglicht die Generation von infektiösen Viruspartikeln in RK13-Zellen, während die Assemblierung von Viren bei der Infektion mit Wildtyp-MVA in diesen Zellen nicht stattfindet. Flankiert wird die Expressionskassette von Sequenzen, die homolog sind zu Sequenzen um die Deletion III im MVA-Genom. Dies ermöglicht die ortsspezifische Insertion des heterologen Gens und des Selektionsmarkers *k11* in diese Deletionsstelle.

Für die Konstruktion der rekombinanten Viren wurden Versionen von *msp1d* bzw. der Fragmente gewählt, bei denen die *P. falciparum*-Transportsignale entfernt wurden. Anstelle dessen wurden die gut charakterisierten Transportsignale des „Decay Accelerating Factor“ (DAF) eingefügt. Diese wurden auch schon im Zusammenhang mit der Expression des *msp1f* in HeLa-Zellen verwendet, und Fusionen aus *msp1f* und dem Sekretionssignal aus DAF (DAF_{ss}) im Kontext mit dem GPI-Verankerungssignal (DAF_{gpi}) führten zu einer Lokalisation von MSP1F auf der Oberfläche der transfizierten Zelle (Burghaus et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Chimäre aus DAF_{ss} und MSP1D allein als auch Konstrukte mit zusätzlichem DAF_{gpi} hergestellt und untersucht. Die Aminosäuresequenzen des DAF_{ss} und des DAF_{gpi} sind in Abbildung 5.6 bzw. 5.7 dargestellt.

5.3.1.1 Integrationsvektoren, welche Fusionen vom *msp1d* Sequenzen an Signalsequenzen zur Proteinsekretion enthalten

msp1d wie auch seine Fragmente liegen in den für die Klonierung verwendeten Ausgangsvektoren als BamHI-ClaI-Fragmente vor. Da aber in der multiplen Klonierungsstelle von pIII_dHR.ssP keine Erkennungssequenz für ClaI vorhanden ist, wurde das Plasmid mit BssHIII linearisiert und die entstandenen, einzelsträngigen DNA-Bereiche am 5'Ende mittels T4 DNA-Polymerase aufgefüllt. Parallel dazu wurden die Vektoren pZE21/d-H42, pZE21/d-H38/42 und pZE21/d-H190 mit ClaI geschnitten und die entstandenen einzelsträngigen DNA-Enden ebenfalls durch T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Die *msp1d*-Fragmente wurden durch einen zweiten Schnitts mit BamHI isoliert (*msp1d*-42: 1212 bp, *msp1d*-38/42: 2451 bp, *msp1d*: 4830 bp) und in den ebenfalls zusätzlich mit BamHI geschnittenen pIII_dHR.ssP ligiert. Daraus resultieren die Plasmide pIII_dHR.ssP/d-42, pIII_dHR.ssP/d-38/42 und pIII_dHR.ssP/d-190. Allerdings fehlt diesen Vektoren das Translationsinitiationskodon ATG, das anschließend zusammen mit der DAF-Sekretionssignalsequenz eingefügt wurde. Zu diesem Zweck wurde das Signal, ausgehend von dem Plasmid pBI-5/f-190-3,4 (ursprünglicher Name: pHD190D), in dem die DAF_{ss} an

das *msp1f*-Gen kloniert ist, über PCR amplifiziert. Der dafür verwendete „Sense-Primer“ (= DAF-sig.sense) besitzt eine zusätzliche BglII-Erkennungssequenz an seinem 5' Ende, gefolgt von der MluI-Schnittstelle. Der „Antisense-Primer“ (= DAF-sig.anti) trägt eine BamHI-Erkennungssequenz an seinem 5' Ende. Die Amplifikation erfolgte nach der unter 4.5.5 beschriebenen Methode mit dem Enzym Pwo-DNA-Polymerase. Das Fragment wurde anschließend in mit EcoRI linearisiertes pSK kloniert und positive Klone sequenziert. Das DAFss wurde über BglII und BamHI aus dem Vektor pSK/DAF-sig isoliert und in die BamHI-Schnittstelle der pIIIHR.ssP Plasmide, welche *msp1d* bzw. dessen Fragmente tragen, eingesetzt. Dies war möglich, da die 5' einzelsträngigen DNA-Überhänge der BglII- und BamHI- Schnittstellen kompatibel sind.

Die resultierenden Plasmide heißen pIIIHR.ssP/d-42-3, pIIIHR.ssP/d-38/42-3 und pIIIHR.ssP/d-190-3.

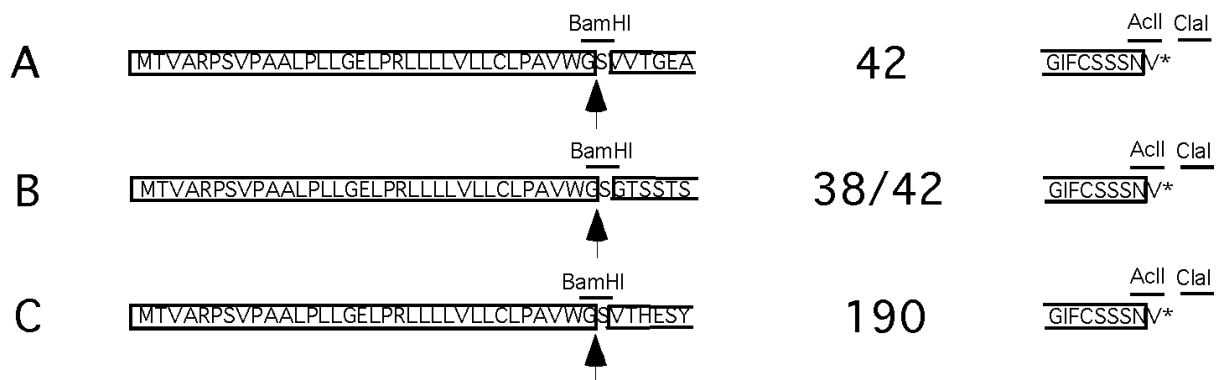


Abb. 5.6: Die N- und C-terminalen Sequenzen der DAFss - MSP1D Fusionsproteine

Das DAF-Sekretionssignal wurde an den N-Terminus des 190 kDa großen MSP1D Proteins des 3D7 Isolates von *P. falciparum* (C) bzw. der C-terminalen Fragmente MSP1D-42 (A) und MSP1D-38/42 (B) fusioniert. Zusätzlich zur Signalsequenz von DAF und der Sequenzen von MSP1D wurde an der Fusionsstelle ein Serin eingefügt, um die Erkennungssequenz für BamHI auf DNA Ebene zu konservieren und somit die Fusion an alle MSP1-Fragmente zu ermöglichen.

Am C-Terminus von MSP1D wurde auf DNA-Ebene die *P. falciparum* *gpi*-Sequenz entfernt und durch die zusätzliche Erkennungssequenz für AcII ersetzt.

5.3.1.2 Integrationsvektoren, welche Fusionen von *msp1d* an Sekretionssignalsequenzen und *gpi*-Signalsequenzen tragen

Wie aus der Literatur bekannt, lösen die auf der Zelloberfläche verankerte und die sekretierte Form eines Proteins unterschiedliche Immunreaktionen aus, die sich sowohl in unterschiedlichen Antikörpertitern wie auch auf Ebene der T-Zellen widerspiegelt (Langford et al., 1986; Yang et al., 1997).

Um diesen Sachverhalt in bezug auf MSP1 zu untersuchen, wurden zusätzlich rekombinante Vaccinia Viren konstruiert, welche zur Verankerung der rekombinanten Proteine auf der Oberfläche der infizierten Zelle führten. Aus diesem Grund wurde in pIIIHR.ssP-Konstrukte,

die für die Chimären aus MSP1 und dem DAF-Signal kodieren, die Sequenz für den DAFgpi eingefügt. In einem ersten Schritt wurde die GPI-Ankersequenz mittels PCR (Primer „CS-2“ und „β-Seq“) aus dem Vektor pBI-5/f-190-3,4 amplifiziert. Dabei wurde die bestehende NsiI-Erkennungssequenz der GPI-Ankersequenz am 5´Ende durch den Primer „CS-2“ gegen eine AclI-Erkennungssequenz ersetzt, und der Anker anschließend über AclI und ClaI in das Plasmid pZE21/d-190-3,7 eingefügt. Der so entstandene Vektor pZE21/d-190-3,4,7 wurde im Weiteren im Rahmen einer Kollaboration zur Herstellung von rekombinanten Masernviren verwendet. Im zweiten Schritt wurde die GPI-Sequenz zusammen mit *mSP1d-42* über PCR aus diesem Vektor amplifiziert. Der „Sense-Primer“ (= p42D sense) hybridisiert über der BstEII-Erkennungssequenz, welche die Fusionsstelle des synthetischen *mSP1d-p38* an *mSP1d-p42* darstellt. Zusätzlich trägt dieser Primer eine BamHI-Erkennungssequenz stromaufwärts der BstEII-Sequenz. Der „Antisense-Primer“ hybridisiert über der ClaI Schnittstelle und trägt zusätzlich eine BssHII Erkennungssequenz am 5´Ende des Primers. In der PCR wurden die Primer bei 56°C an ihr DNA-Matrize hybridisiert und in 20 Zyklen durch die Pwo-DNA-Polymerase amplifiziert. Das 1250 bp DNA-Fragment wurde gereinigt und wie schon unter 5.3.1.1 beschrieben in pSK⁺ kloniert (pSK⁺/d-42-4).

Zur Konstruktion von pIIIdHR.ssp/d-42-3,4 wurde das *mSP1d42-DAFgpi*-Fragment über BamHI und BssHII aus pSK⁺/d-42-4 isoliert und in pIIIdHR.ssp/DAFss eingesetzt. Nach dem Verdau von pSK⁺/d-42-4 mit BstEII und BssHII konnte das Fragment in BstEII / BssHII geschnittenen pIIIdHR.ssp/d-83/30/38-3 bzw. pIIIdHR.ssp/d-38-3 ligiert werden. Daraus resultieren pIIIdHR.ssp/d-190-3,4 und pIIIdHR.ssp/d-38/42-3,4.



Abb. 5.7: Die N- und C-terminalen Sequenzen des DAFss - MSP1D-42 - DAFgpi - Fusionsproteins

Zusätzlich zu dem DAF-Sekretionssignal am N-Terminus der DAFss – MSP1D-42 wurde auf DNA-Ebene über die Erkennungssequenzen für AclI und ClaI die DAF-gpi-Sequenz eingefügt.

Diese Modifikation des C-Terminus wurde auch bei MSP1D-38/42 und dem Gesamtlänge-MSP1D durchgeführt und entspricht der hier dargestellten Sequenz.

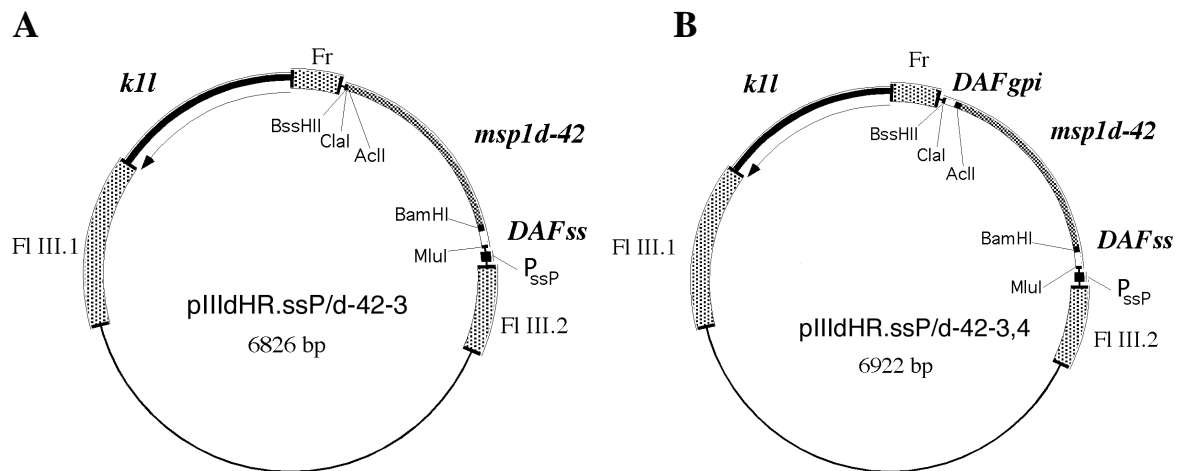


Abb. 5.8: MVA spezifische *msp1d-42* Integrationsvektoren

A zeigt die graphische Darstellung des Vektors pIIIIdHR.ssp/d-42-3. Das *msp1d-42* einschließlich des DAF-Sekretionssignals (*DAFss*) steht unter Kontrolle des synthetischen MVA Promotors P_{ssp} , der während der frühen und der späten Transkriptionsphase aktiv ist. Flankiert wird das *msp1d-42-3* Gen stromabwärts von „*k11*“, dem Selektionsgen. Im weiteren folgt „FI III.1“, eine Sequenz, die homolog ist zu DNA-Sequenzen im Bereich der Deletion III im Genom von MVA. Am 5' Ende wird die *msp1d* Sequenz flankiert von „FI III.2“, ebenfalls ein Bereich, der homolog ist zur DNA im Anschluß an die Deletion III im MVA-Genom. Zwischen *msp1d-42* und *k11* befindet sich „*fr*“, das seinerseits homolog ist zu Sequenzen in „FI III.2“ und damit die Elimination von *k11* bei fehlendem Selektionsdruck bewirkt.

B zeigt das Plasmid pIIIIdHR.ssp/d-42-3,4. Es entspricht dem in A dargestellten Vektor mit Ausnahme der zusätzlichen Modifikation des *msp1d-42* Gens. In diesem Fall trägt *msp1d-42* zusätzlich zum DAF-Sekretionssignal am 5' Ende (*DAFss*) die Information für den DAF-gpi-Anker am 3' Ende der kodierenden Sequenz (*DAFgpi*).

5.3.2 Transiente Expression von *msp1* in MVA-infizierten Zellen

5.3.2.1 Nachweis von transient synthetisierten MSP1D-Fragmenten

Um zu überprüfen, ob sich MSP1 unter Kontrolle des synthetischen Promotors P_{ssp} im Kontext von MVA exprimieren lässt, wurden transiente Expressionsexperimente mit jeweils beiden Versionen (verankert und sekretiert) von *msp1d-42*, *msp1d-38/42* und *msp1d* durchgeführt. Wie unter 4.8.1. beschrieben wurden BHK21-Zellen mit Wildtyp-MVA infiziert und anschließend mit pIIIIdHR.ssp-Plasmiden transfiziert, welche *msp1d* bzw. Fragmente des Gens tragen. Zellen, die p42 bzw. p42+p38 synthetisierten, wurden in 1x Proteinauftragspuffer abgelöst, über 10%ige SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt und nachfolgend im Immunoblot unter Verwendung von mAb 5.2 und AP-konjugiertem anti-Maus-IgG analysiert. Sowohl sekretiertes als auch verankertes p42 tritt als Doppelbande zwischen 40 und 48 kDa auf (Abb. 5.9, A: Spur 2 und 3). MSP1D-42 weist eine potentielle N-Glykosylierungsstellen auf, so dass bei der Trennung des Gesamtzellextrakts unterschiedliche Glykosylierungszustände nachgewiesen werden. Außerdem erscheint eine Doppelbande etwas oberhalb der 116 kDa-Markerbande, die auf Grund der Laufhöhe Rückschlüsse auf die Ausbildung von Di- oder möglicherweise sogar

Trimeren zulässt. Diese Di- bzw. Trimere verschwinden sobald die Auftrennung der Proteine in Gegenwart von DTT als reduzierendem Agens durchgeführt wurde (siehe Kapitel 5.3.4.1, Abb. 5.14, B).

Auch die Fusion von p38 und p42 führt zur Färbung mehrerer Banden (Abb. 5.9, A: Spur 4 und 5). Dabei zeigt selbst die jeweils unterste Bande eine für p38/42 unerwartet geringe Mobilität in der SDS-PAGE, die möglicherweise auf die Glykosylierung (p38/42 enthält fünf potentielle Glykosylierungsstellen) zurückzuführen ist. Wie schon für p42 erwähnt, kann die zweite Bande durch unterschiedliche Konformationen in Kombination mit Glykosylierungen oder auch auf sehr kompakt gefaltete Dimere, die durch intermolekulare Disulfidbrücken gebildet wurden, erklärt werden.

Neben den beschriebenen Banden werden im Immunoblot mit mAk 5.2 bei der Auftrennung der beiden verankerten MSP1D-Fragmente zusätzliche Banden bei ca. 20 – 30 kDa nachgewiesen (Spur 3 und 5) die schon von I. Türbachova im Zusammenhang mit der Expression von *mSP1f* in *T. gondii* beobachtet wurde. Diesen Aspekt werde ich in Kapitel 5.3.4.1 noch einmal aufgreifen.

Da die Expressionseffizienz im Fall von *mSP1d* weit unter der der C-terminalen Proteinfragmente lag, wurden die infizierten/transfizierten BHK21-Zellen zum Nachweis des Gesamtproteins in 1 ml Mg^{2+}/Ca^{2+} freiem PBS je 3,5 cm Schale abgelöst und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren ($-80^{\circ}C$) und Auftauen lysiert. Das Lysat wurde dreimal 10 sec mit der Mikrospritze bei einer Stärke der Stufe 6 ultrabeschallt, 20 min bei 13000 upm im Kühlraum zentrifugiert, in zwei Schritten über 500 μ l-Zentrifugationskonzentratoren für Proteine >50 kDa aufgetragen und etwa 1 h bei $4^{\circ}C$ und 5000 upm in der Eppendorf Tischzentrifuge auf ein Volumen von 50 μ l konzentriert. Das Konzentrat wurde mit 2x Proteinauftragspuffer gemischt und über 10%ige SDS-PAGE getrennt. Der anschließende Immunoblot wurde mit mAk 5.2 als Erst- und POD-konjugiertem anti-Maus-IgG als Zweitantikörper inkubiert und über Chemolumineszenz analysiert. Parallel wurden auch die unlöslichen Bestandteile aufbereitet, der Immunoblot dieser Fraktion zeigte jedoch kein für MSP1 spezifisches Signal (Daten nicht gezeigt).

MSP1-Gesamtproteine sowohl des 3D7- als auch des FCB-1-Isolats wurden als Doppelbande oberhalb der 180 kDa-Markerbande angefärbt (Abb. 5.9, B: Spuren 1, 2 und 4). Auch hier könnte es sich um unterschiedliche Konformationen und/oder Glykosylierungen handeln. Für MSP1D trat je eine weitere Bande bei ca. 40 kDa auf (Spur 2 und 4), die auf N-terminale Degradation zurückzuführen sein könnte. Im Fall von MSP1F wurde kein Protein dieser Größe angefärbt.

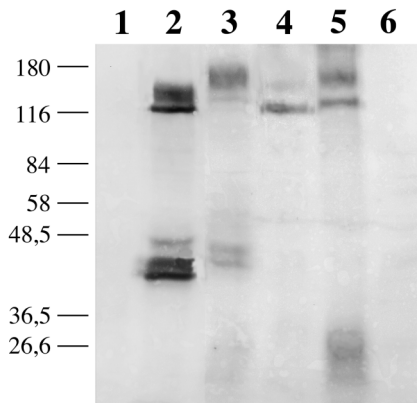
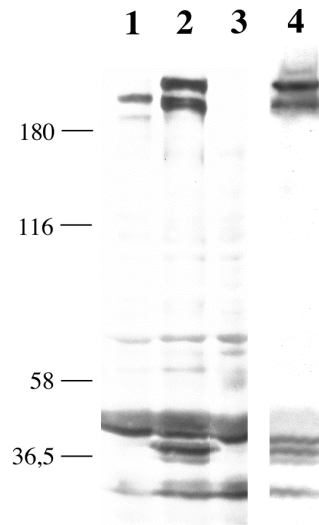
A**B**

Abb. 5.9: Immunoblot der transienten Expression von *msp1d* und *msp1d*-Fragmenten in MVA-infizierten BHK21-Zellen

A zeigt die Immunoblotanalyse der transienten Expression von *msp1d-42* in sekretierter (Spur 2) und verankerter Form (Spur 3) im Immunoblot mit mAk 5.2 als erstem Antikörper. Beide Versionen von MSP1D-42 treten in Form von Doppelbanden von etwa 40 – 50 kDa und etwa 116 – 160 kDa auf. Die Spuren 4 und 5 zeigen die transiente Expression von *msp1d-38/42* ebenfalls in sekretierter (Spur 4) und verankerter Form (Spur 5). Die Proteine werden je als Doppelbanden nachgewiesen. Auffallend sind zusätzliche Banden bei ca. 20 – 30 kDa in den Spuren, in denen die jeweils oberflächenverankerten Fragmente Aufgetrennt wurden (Spuren 3 und 5).

Als Negativkontrolle dienten mit Wildtyp-MVA infizierte BHK21-Zellen, die nicht zusätzlich transfiziert wurden (Spur 1) und nicht infizierte und Transfizierte BHK21-Zellen (Spur 6).

Spur 1 zeigt Wildtyp-MVA infizierte, nicht mit DNA transfizierte BHK21-Zellen.

B zeigt die Immunoblotanalyse der transienten Expression von sekretiertem und verankertem *msp1d*. Die infizierten und transfizierten Zellen wurden in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS geerntet, nach der Lyse über Zentrifugationskonzentratoren angereichert, über 10%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und über mAk 5.2 und POD-konjugiertes anti-Maus-IgG im Immunoblot nachgewiesen. Spur 1 zeigt die Expression von *msp1f* durch rekombinante MVA. Diese Viren tragen das synthetische Gen unter Kontrolle des Promotors p7.5 in der Deletion II des MVA-Genoms (Hergestellt von E. Ravot in Kollaboration mit dem Labor von Dr. G. Sutter). Spur 2 zeigt die transiente Expression von *msp1d* fusioniert an das DAF-Sekretionssignal, Spur 4 die Expression von *msp1d* als Fusion an das Sekretionssignal und die DAF-gpi-Sequenz. In allen Fällen erscheinen die Signale für das Parasitenprotein als Doppelbande oberhalb der 180 kDa-Markerbande. Zusätzlich ist bei MSP1D je eine weiteres Signal etwas auf Höhe von 40 kDa zu erkennen, das bei beiden Kontrollen (Spur 1 und 3) fehlt.

Spur 3 zeigt die Negativkontrolle (BHK21-Zellen mit Wildtyp-MVA infiziert und nicht transfiziert).

5.3.3 Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren (MVA)

Auf Grund der höheren Expressionseffizienz von *msp1d-42* und *msp1d-38/42* verglichen zum Gesamt-Gen sowohl im Kontext rekombinanter Viren wie auch im transienten Ansatz wurde sekretiertes bzw. über GPI verankertes *msp1d-42* und *msp1d-38/42* als erste Modellsysteme gewählt.

5.3.3.1 Herstellung rekombinanter MVA zur Expression von *msp1d-42* und *msp1d-38/42*

Wie unter 4.8.2.1 beschrieben wurden vier Rekombinationen unter Verwendung der Plasmide *pIIIdHR.ssp/d-42-3*, *pIIIdHR.ssp/d-42-3,4*, *pIIIdHR.ssp/d-38/42-3* und *pIIIdHR.ssp/d-38/42-3,4* angesetzt.

Die so gewonnenen rekombinanten MVA tragen folgende Namen: rMVA-*msp1d/42S* („S“ = sekretiert) im Fall der Rekombination von *pIIIdHR.ssp/d-42-3* in das Genom des Virus, rMVA-*msp1d/42A* („A“ = verankert) für *pIIIdHR.ssp/d-42-3,4*, rMVA-*msp1d/38+42S* und rMVA-*msp1d/38+42A* analog zu den beiden vorher genannten.

Nach der ersten Passage der Rekombinationsansätze auf RK13-Zellen konnte sowohl MSP1D-42 als auch MSP1D-38/42 durch Immunblot-Analyse mit mAb 5.2 nachgewiesen werden. Als Qualitätskontrolle und um die Stabilität der rekombinanten MVA zu überprüfen wurden auch in jeder weiteren Passage Immunoblot-Analysen oder Immunperoxidase-Färbungen durchgeführt. Diese zeigten für die vier verschiedenen Virustypen eine stabile und hohe Expressionsrate der heterologen Gene. Zusätzlich zu Expressionskontrollen durch die immunologischen Methoden wurden PCR-Analysen mit der Virus DNA als Matrize unter Verwendung der Primer „GS83“ und „fIIIb1“ durchgeführt. Diese Primer hybridisieren an die Sequenzen, die auch die Rekombination der Expressionskassetten in das Virusgenom vermittelten. D.h. im rekombinanten Virus wird die Expressionkassette und im Wildtyp-MVA lediglich die Rekombinationssequenz (in diesem Fall Sequenzen, die die Deletion III flankieren) amplifiziert. Das Wildtyp-MVA-Amplifikat ist 776 bp groß, während für die Expressionskassetten Amplifikate von 3342 bp (rMVA-*msp1d/42S*), 3445 bp (rMVA-*msp1d/42A*), 4581 bp (rMVA-*msp1d/38+42S*) bzw. 4674 bp (rMVA-*msp1d/38+42A*) zu erwarten waren.

Nach mehreren Viruspassagen waren für alle vier rekombinanten MVA Virusklone nachweisbar, die durch die Passage auf RK13-Zellen und damit durch die Selektion auf *kll*-eprimierende Viren Wildtyp-MVA Reste verloren hatten, wie anhand des fehlenden Amplifikats von 776 bp erkennbar wurde. Wie in Abbildung 5.10 exemplarisch für vier rMVA-*msp1d/42S*-Klone dargestellt, wurden in der PCR lediglich zwei Banden sichtbar (Spuren I – IV). Die jeweils obere der beiden Banden entspricht dem Amplifikat der gesamten Expressionskassette, die auch durch die PCR mit dem Ausgangsplasmid als DNA-Matrize amplifiziert wurde. Die zweite Bande ist 1,4 kb kleiner und entspricht dem oben genannten DNA-Fragment ohne *kll*. Die Amplifikation dieses kleineren Fragments erklärt sich durch die interne Rekombination der homologen Sequenzen, die *kll* flankieren. Auch in RK13-Zellen findet diese Rekombination statt, die entstehenden Viren sind jedoch nicht mehr fähig, in diesen Zellen infektiöse Partikel zu generieren, da ihnen der dazu notwendige Faktor K1L fehlt. D.h. diese Viruspopulationen entstehen und werden über die PCR mit „GS83“ und „fIIIb1“ nachgewiesen, werden aber durch die fortlaufende Passage über RK13-Zellen nicht weiter propagiert.

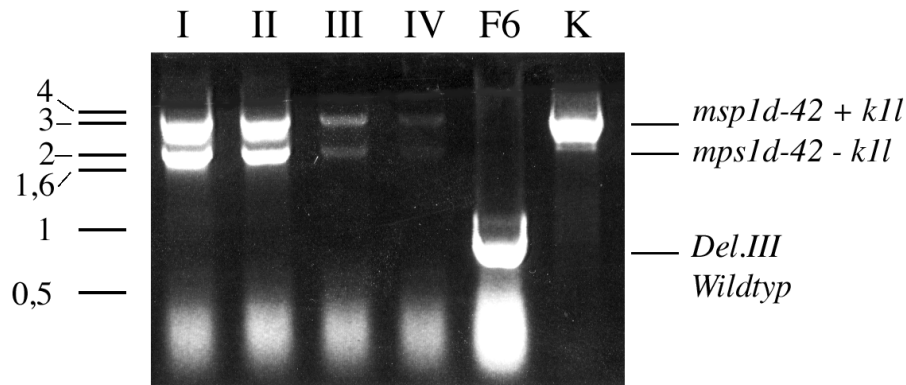


Abb. 5.10: Test auf Reste von Wildtyp-MVA mittels PCR-Analyse

Nach der 10. Passage von vier MVA-*msp1d*/42S-Klonen in RK13-Zellen wurden die Zellen zwei Tagen nach der Infektion geerntet und die DNA isoliert. Mit den Primern „GS83“ und „fIIIb1“ wurde eine PCR durchgeführt, die im Fall von Wildtyp-MVA DNA-Sequenzen um die Deletion III amplifizieren (Spur F6) und bei rekombinanten MVA zusätzlich die jeweils eingebrachte Fremd-DNA (Spuren I, II, III, IV). Die obere Bande im Fall von rMVA-*msp1d*/42S entspricht *msp1d-42-3* und *kll* mit den jeweiligen Promotoren und flankierenden Sequenzen. Die 1,4 kb kleinere Bande entspricht dieser Sequenz ohne *kll*. In einer weiteren Kontroll-PCR wurde 0,1 µg pIII_dHR.ssp/d-42-3,4 als Matrize eingesetzt (Spur k), deren Amplifikat der oberen Bande der PCR mit rekombinanter Virus-DNA entspricht.

Im einzelnen waren mehrere Klone von rMVA-*msp1d*/42S nach der 10 Passage in RK13-Zellen „Wildtyp-frei“, ein Klon von rMVA-*msp1d*/42A nach 15 Passagen. Bei rMVA-*msp1d*/38+42S und 38+42A war es nicht möglich, die komplette Expressionskassette über die Primer „GS83“ und „fIIIb1“ aus dem MVA-Genom zu amplifizieren. Daher wurden als Kontrolle zwei im *msp1d*-Gen hybridisierenden Primer gewählt, die zusammen mit jeweils einem der externen, in den Rekombinationssequenzen bindenden Primern zwei zusätzliche Amplifikate lieferten. Als Kombinationen wurden „p36Ia“ und „GS83“ bzw. „fIIIb1“ und „3D7p19anti“ gewählt. Nach 17 Passagen in RK13-Zellen zeigten drei von drei rMVA-*msp1d*/38+42A Klonen je eine deutliche DNA-Bande der erwarteten Größe in der PCR mit p36IIa und GS83, aber kein Amplifikat über „GS83“ und „fIIIb1“, welches Wildtyp-MVA entsprach. Für rMVA-*msp1d*/38+42S waren zwei der drei getesteten Virusklone positiv für beide Kontroll-Amplifikationen und negativ in Bezug auf Wildtyp-MVA Reste (Daten nicht gezeigt).

Auch während der folgenden Passagen der Viren auf BHK21-Zellen wurden die MSP1D-Fragmente von MSP1 über immunologische Methoden nachgewiesen. Nach weiteren 10 bis 13 Passagen, je nach Virusklon, war das Selektionsgen *kll* über interne Rekombination aus den rekombinanten MVA-Genomen entfernt worden. Das wurde deutlich in einer weiteren PCR mit den Primern „GS83“ und „fIIIb1“ (Abb. 5.11): Ist *kll* über interne Rekombination eliminiert, so erscheint in der PCR lediglich die Bande für die heterologe Expressionskassette ohne *kll*, die der unteren der beiden Banden in der vorhergehenden PCR entspricht. Als empfindlichere Testmethode erwies sich jedoch die Infektion von RK13 mit diesen Viren: Zeigen die Zellen keinen für die Infektion mit K1L-positiven MVA typischen Phänotyp in Form der „Foci“, so können die Virusklone als „*kll*-frei“ betrachtet und amplifiziert werden.

(Zu beachten ist allerdings, dass RK13-Zellen bei der Infektion mit *k11*-freien Viren durchaus einen cytopathischen Effekt in Form größerer, sich abrundender Zellen aufweisen.) Im Einzelnen waren rMVA-*msp1d*/42S nach 13 Passagen und rMVA-*msp1d*/42A nach 10 Passagen „*k11*-frei“, rMVA-*msp1d*/38+42S und rMVA-*msp1d*/38+42A hatten das Selektionsgen nach je 10 und 11 Passagen verloren.

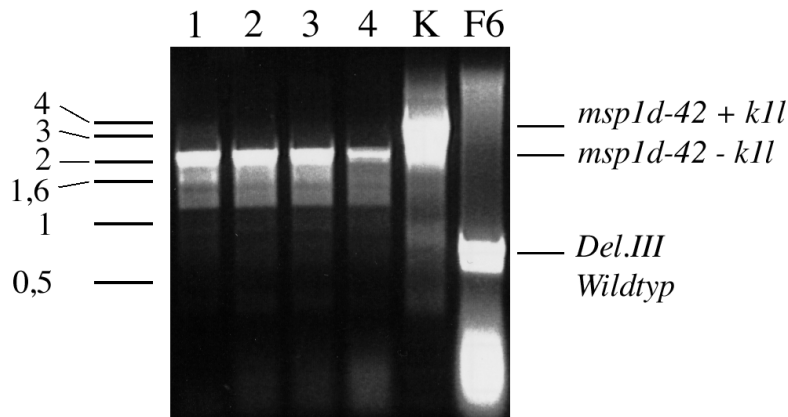


Abb. 5.11: PCR-Analyse als Test auf den Verlust von *k11*

DNA aus vier Klonen von rMVA-*msp1d*/42S nach 13 BHK21-Passagen wurde mit „GS83“ und „fIIIb1“ amplifiziert und über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt. Die im Fall der Rekombinanten sichtbare Bande (Spur 1 bis 4) entspricht der Expressionskassette ohne *k11*. Als Kontrolle (K) diente das Amplifikat aus der PCR mit pIIIHR.ssp/d-42-3 als Matrize, es liefert das 1,4 kb größere DNA-Fragment mit *k11*. DNA aus Wildtyp-MVA infizierten Zellen fungierte hier als Negativkontrolle (F6).

5.3.4 Analyse rekombinanter MVA

5.3.4.1 Analyse rekombinanter MVA, welche *msp1d-42* und *msp1d-38/42* exprimieren

Um die Expression der C-terminalen *msp1d*-Fragmente und die Lokalisation der Produkte in infizierten humanen Zellen zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen in so genannten „Chamber-Slides“ ausgesät, mit den entsprechenden rekombinanten Viren (MOI = 1) infiziert, ÜN inkubiert und für die indirekte Immunfluoreszenz (IFA) fixiert. Bei jeweils einem Ansatz wurde die Zellmembran durch Behandlung mit Triton X-100 permeabilisiert, um auch die Proteine innerhalb der Zelle zu analysieren. In der IFA wurden mAk 5.2. und anti-Sec61 β als primäre Antikörper eingesetzt. Letzterer erkennt das ER-spezifische Protein Sec61 β und diente als Marker zur Lokalisation von MSP1D-42. mAk 5.2 wurde erkannt durch Cy3-konjugiertes anti-Maus-IgG, das bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 552 nm rot erscheint. Anti-Sec61 β wurde durch FITC-markiertes anti-Kaninchen-IgG gebunden, dessen Farbstoff bei Anregung mit UV-Licht (495 nm) grün leuchtet. Alle MSP1-Fragmente konnten innerhalb der infizierten Zelle nachgewiesen werden und ließen sich u.a. mit dem ER-Proteins Sec61 β im ER kolokalisieren (Abb. 5.12: „+ Triton X-100“). An der Oberfläche nachgewiesen wurden nur die Proteine, die sowohl das DAF-Sekretionssignal wie auch die DAF-gpi-Ankersequenz trugen (Abb.: 5.12: „- Triton X-100“). Die Analyse von HeLa-Zellen,

die mit rMVA-*msp1d/38+42S* bzw. rMVA-*msp1d/38+42A* infiziert wurden, zeigten das gleiche Lokalisationsprofil (Daten nicht gezeigt).

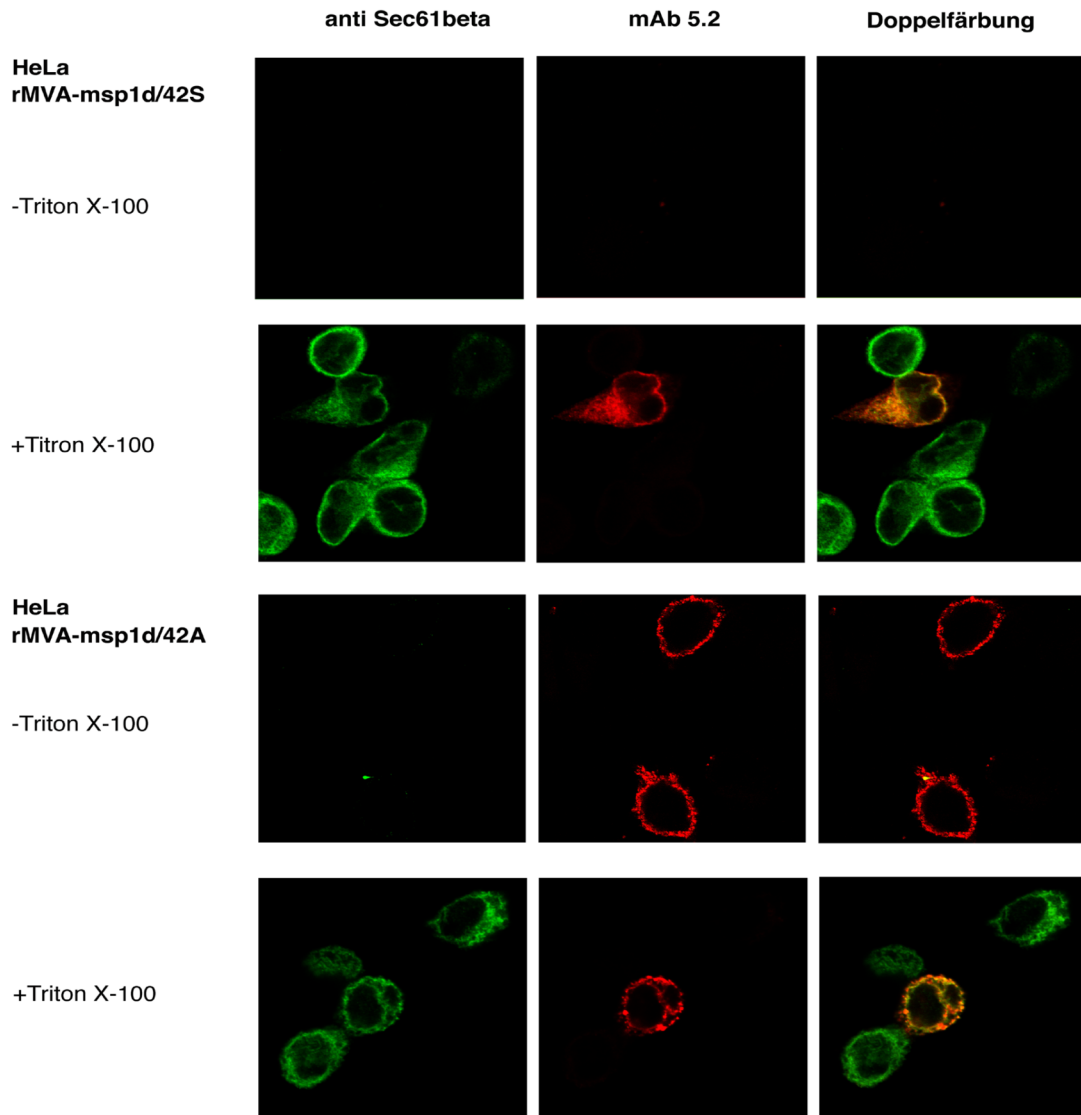


Abb. 5.12: Expression von *msp1d-42* in mit rekombinanten MVA-infizierten HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit rMVA-*msp1d/42S* bzw. rMVA-*msp1d/42A* infiziert und anschließend fixiert. Die zweite und vierte Zeile zeigt jeweils Zellen, die nach der Fixierung mit Triton X-100 permeabilisiert wurden (+ Triton X-100), während die Membran der Zellen in Zeile eins und drei intakt blieb (- Triton X-100). Die so behandelten Zellen wurden mit mAk 5.2 und anti-Sec61beta als erstem Antikörper inkubiert, diese über Cy3-konjugierte anti-Maus-IgG (erkennt mAk 5.2) bzw. FITC-konjugierte anti-Kaninchen-IgG (erkennt anti-Sec61beta) farblich markiert und anschließend im konfokalen Mikroskop analysiert. Wurden die Zellen mit rMVA-*msp1d/42S* bzw. rMVA-*msp1d/42A* infiziert und permeabilisiert (+ Triton X-100), so kann das Signal für MSP1D-42 (mAk 5.2) kolokalisiert werden mit dem Signal für das ER-Protein Sec61beta. Blieben die Zellen hingegen unversehrt (- Triton X-100), so wird MSP1D-42 nur im Fall der Infektion mit rMVA-*msp1d/42A* auf

der Oberfläche der infizierten Zellen erkannt. Anti-Sec61beta fungierte hier als Kontrolle für die Unversehrtheit der Zellmembran.

Die Synthese dieser Proteine wurde ebenfalls durch Immunoblot nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden RK13- bzw. HeLa-Zellen mit Virus infiziert und ÜN inkubiert. 200 µl des Mediums wurden entnommen und mit dem gleichen Volumen 2x Proteinauftragspuffer gemischt, dann das restliche Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, bevor sie in je 250 µl 1x Protein-Probenauftragspuffer abgelöst wurden. Analysiert wurde der Immunoblot mit mAk 5.2 als Erst-Antikörper.

Infiziert man Zellen mit rekombinatem MVA, das für die C-terminalen Bereiche von *msp1d* mit der DAF-Signalsequenz kodiert, so erscheinen im Immunoblot Signale sowohl für die zelluläre Fraktion als auch in der Spur, in der die Bestandteile aus dem Überstand aufgetrennt wurden (Abb. 5.13: A). Analysiert man dagegen rMVA-*msp1d*/A-Präparationen, so werden nur Banden in der zellulären Fraktion angefärbt. Dabei lässt die Laufrhöhe der verankerten Proteine auf ein höheres Molekulargewicht im Vergleich zu den sekretierten Proteinen schließen, was sich mit dem zusätzlichen GPI-Anker deckt. Wie anhand der Laufstrecke der angefärbten Banden zu erkennen ist, bilden die C-terminalen Fragmente Proteinaggregate, die auf Dimer- oder Trimerbildung hinweisen (Doppelbanden oberhalb der 116 kDa-Markerbande). Aber auch unterschiedliche Konformationen der rekombinanten MSP1D-Fragmente, wie auch Glykosylierungszustände spielen eine Rolle. Die Multimerbildung ist vor allem im Überstand zu beobachten. Je nach Präparation wurden aber auch monomere Proteine nachgewiesen. Unter Umständen begünstigt eine hohe Proteinkonzentration im Überstand die Bildung der beobachteten Multimere.

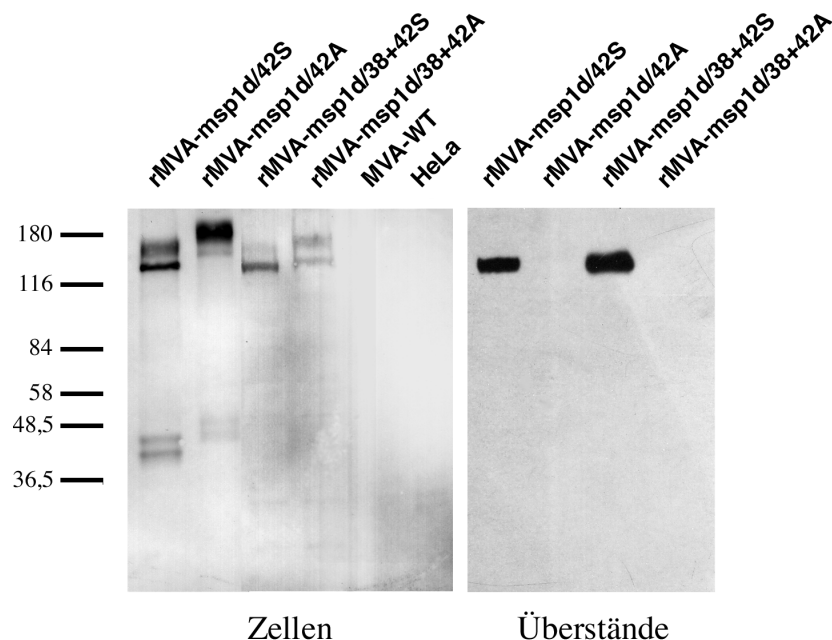
Um zu untersuchen, welchen Einfluß die Ausbildung intra- wie auch intermolekularer Disulfidbrücken auf das Laufverhalten der C-terminalen MSP1D-Fragmente hat, wurden BHK21-Zellen mit rMVA-*msp1d*/42S, rMVA-*msp1d*/42A, rMVA-*msp1d*/38+42S bzw. rMVA-*msp1d*/38+42A infiziert und die zellulären Proteine nach der Inkubation in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von DTT über 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mit polyklonalem Serum aus Kaninchen inkubiert, das gegen den Teil von MSP1D-42 N-terminal der EGF-ähnlichen Domänen gerichtet sind (= anti-MSP1D-42ΔEGF). MSP1D-42 wurde durch AP-gekoppeltes anti-Kaninchen-IgG angefärbt. Wie in Abbildung 5.13 B sichtbar, werden die in für MSP1D-42 nachgewiesenen Di- bzw. Trimer oberhalb der 116 kDa-Markerbande (Spuren 1 und 2) durch intermolekulare Disulfidbrücken gebildet, da sie nach der Reduktion aller Disulfide durch DTT im Probenpuffer nicht mehr nachweisbar sind (Spuren 5 und 6). Aber auch die Monomere der Proteine verändern ihr Laufverhalten. Unter reduzierenden Bedingungen verringert sich die Mobilität im elektrischen Feld für sekretiertes MSP1D-42, ohne DTT erscheint das Protein als Bandengemisch, das einem Molekulargewicht von ca. 38 – 45 kDa entspricht, während das Protein nach der Reduktion der Disulfide durch DTT als Doppelbande auf der Höhe von ca. 45 und 48 kDa nachweisbar ist. Das bedeutet, dass die Ausbildung der intramolekularen Brücken zu kompakterer Faltung und damit geringerem Widerstand in der Gelelektrophorese führt. Das gleiche gilt für oberflächenverankertes MSP1D-42: Die Di- bzw. Trimerbanden verschwand, während sich das Laufverhalten der

Monomer-Doppelbande von ca. 44 und 46 kDa auf das Laufverhalten von Proteinen der Größe 48,5 und 50 kDa veränderte. Zusätzlich geht die Reduktion in beiden Fällen mit einer Fokussierung der Banden einher.

MSP1D-38/42 wurde jeweils in Form von zwei Banden von je ca. 86 kDa und ca. 120 kDa durch anti-MSP1D-42 Δ EGF erkannt (Spuren 3 und 4 für die sekretierte und verankerte Variante). Die durch mAk 5.2 gebundenen zweite Bande oberhalb des 116 kDa-Marker Proteins (Abb. 5.13: A) wurde durch das polyklonale Antikörpergemisch weniger gut erkannt, und war hier lediglich bei der oberflächenverankerten Version von p38+42 angefärbt. Die Bande bei ca. 86 kDa entspricht den erwarteten Molekulargewicht des Proteins ohne angefügt Zuckerreste. Dass diese Bande durch mAk 5.2 nicht oder nur sehr schwach erkannt wurde, liegt möglicherweise an Disulfidbrücken in der EGF-ähnlichen Domäne 1, die nicht in der durch den monoklonalen Antikörper erkannten Konfiguration vorlagen. Waren alle Cysteine von p38+42 reduziert, so beobachtete man auch hier in jedem Fall eine Verschiebung des Laufverhaltens zu höherem Molekulargewicht hin (Spuren 7 und 8). Auch hier scheint die Ausbildung von Disulfidbrücken zu einer kompakteren Konformation und damit größerer Mobilität in der SDS-PAGE zu führen. Außerdem wird deutlich, dass es sich bei den Banden von ca. 120 kDa nicht um über Cysteine verbundenen Dimere handelte, sondern wahrscheinlich um die glykosylierte Form der MSP1D-Fragmente.

In Spur 9 der Immunoblot-Analyse wurde der Zellextrakt von Wildtyp-MVA infizierten BHK21-Zellen aufgetrennt. Er zeigt die Proteine, die durch anti-MSP1D-42 Δ EGF unspezifisch binden wurden.

A



B

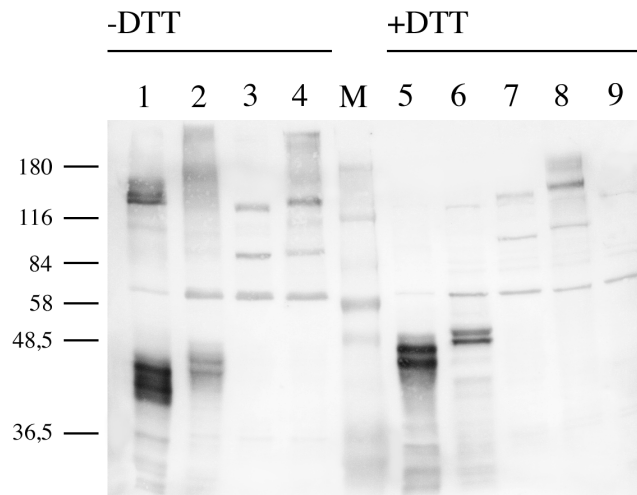


Abb. 5.13: Nachweis von MSP1D-42 und MSP1D-38/42 in mit rekombinanten MVA infizierten HeLa-Zellen mittels Immunoblot

A HeLa-Zellen wurden mit rMVA-msp1d/42S, rMVA-msp1d/42A, rMVA-msp1d/38+42S bzw. rMVA-msp1d/38+42A infiziert und ÜN inkubiert. Proben des Überstands und der zellulären Fraktion wurden über 10%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels mAb 5.2 als Erstantikörper nachgewiesen. Nur Chimäre aus DAF-Signalsequenz und den entsprechenden MSP1D-Fragmenten lassen sich in den Überständen der infizierten Zellen nachweisen, während die intrazelluläre Expression in allen mit rekombinanten MVA infizierten Zellen ein Signal liefert. Dabei reiten alle Proteine wie schon vorher beobachtet in Form von mehreren Banden auf, die sich durch unterschiedlichen Konformationen, Glykosylierungszustände bzw. Multimerbildung erklären lassen. Als Negativkontrollen fungierten mit Wildtyp-MVA infizierte HeLa-Zellen (MVA-WT) und nicht infizierte Zellen (HeLa).

B BHK21-Zellen wurden mit rekombinanten MVA infiziert, ÜN inkubiert und die zelluläre Fraktion über 10%ige SDS-PAGE unter nichtreduzierenden (-DTT) und reduzierenden Bedingungen (+DTT) aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die C-terminalen Fragmente von MSP1D durch anti-MSP1D-42ΔEGF aus Kaninchen als Erstantikörper gebunden und mittels AP-gekoppeltes anti-Kaninchen-IgG angefärbt.

In Spur 1 und 5 wurden Proteine aus Zellen aufgetrennt, die mit rMVA-msp1d/42S infiziert wurden, die Zellen für Spur 2 und 6 wurden mit rMVA-msp1d/42A infiziert, in Spur 3 und 7 mit rMVA-msp1d/38+42S und Spur 4 und 8 zeigen Proteine aus rMVA-msp1d/38+42A infizierten Zellen. In Spur 9 sind die Proteine der mit Wildtyp-MVA infizierten BHK21-Zellen aufgetrennt, sie spiegeln die unspezifische Bindung des polyklonalen Kaninchenserums wider.

Wurde ein Immunoblot, auf dem der Zellextrakt mit rMVA-msp1d/42S bzw. rMVA-msp1d/42A infizierter HeLa-Zelle aufgetrennt war, lang exponiert, so erschienen weitere Bande, die durch mAk 5.2 erkannt wurden und zwischen 20 und 30 kDa groß waren (Abb. 5.14). Da mAk 5.2 ein Epitop innerhalb der ersten EGF-ähnlichen Domäne erkennt, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um C-terminale Degradations-Produkte handelt, bzw. unterschiedliche Konformationen eines Degradations-Produkts. Ähnliche Fragmente wurden auch im Rahmen der Dissertation von I. Türbachova an MSP1F aus rekombinanten *Toxoplasma gondii* beobachtet, das mit *T. gondii*-spezifischen Sekretions- und GPI-Signalen versehen waren (I. Türbachova, 2000). Dieses Fragment komigrierte mit rekombinant hergestelltem MSP1F-19 aus *T. gondii*. Dies legt Spekulationen nahe, nach denen es sich bei diesem zusätzlichen Fragment um p19 handeln könnte, zumal die für das sekundäre

Prozessierung verantwortliche Protease (Cooper et al., 1992) bisher nicht isoliert werden konnte.

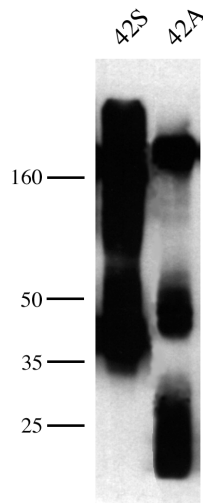


Abb. 5.14: Nachweis eines verkürzten C-terminalen MSP1D-Fragments mittels Immunoblot.

HeLa-Zellen wurden mit rMVA-msp1d/42S (42S), bzw. rMVA-msp1d/42A (42A) infiziert, ÜN inkubiert, mit 1x PBS gewaschen und anschließend über 10%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nachdem dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden sie mit mAk 5.2 als Erst- und POD-konjugiertem anti-Maus-IgG inkubiert. Bei einer verlängerten Exposition wurden zusätzlich in der Reihe der rMVA-msp1d/42A-infizierten HeLa-Zellen zu den schon in Abb. 5.14 beschriebenen Banden weitere Banden von ca. 20 - 30 kDa angefärbt.

5.3.4.2 Analyse der Epitopfaltung in C-terminalen Fragmenten von MSP1

Da nativem MSP1 bis dato keine eindeutige Funktion zugeordnet werden kann, ist es nicht möglich, die Funktionsfähigkeit von rekombinantem MSP1 durch einen funktionellen Test zu überprüfen. Eine Möglichkeit zur Charakterisierung der Konformation rekombinanter Proteine sind monoklonale Antikörper, die das native Protein erkennen. Erkennen diese Antikörper konformationelle Epitope, so gibt die Bindung des heterolog hergestellten Proteins durch diese Antikörper Hinweise auf die Faltung des Proteins in dem jeweiligen Bereich.

Um den C-terminalen Bereich von MSP1D zu untersuchen, habe ich im Rahmen dieser Arbeit neben mAk 5.2 auch mAk 12.8 und mAk 12.10 zur Analyse mittels Immunoblot eingesetzt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Jana McBride). Diese Antikörper erkennen konformationelle Epitope der EGF-ähnlichen Bereiche von MSP1-19. In *in vitro* Experimenten binden mAk 12.10 und 12.8 derart an MSP1 auf der Oberfläche der Merozoiten, dass sie die Prozessierung von MSP1-42 zu MSP1-19 und MSP1-29 und damit die Invasion des Parasiten in den Erythrozyten verhindern (Guevara Patino et al., 1997). Auch rekombinante, über rMVA-msp1d/42S und 42A hergestellte Proteine wurden durch mAk 12.10 und mAk 12.8 erkannt, wobei die Signale von mAk 12.10 bei gleicher Verdünnung (1:1000 in Blockierungspuffer) schwächer erschienen als die Signale von mAk 12.8, allerdings ist auch die Reaktivität mit nativem MSP1D unterschiedlich. Auffallend war, dass sekretiertes p42 stärker mit mAk 12.8 reagierte als sekretiertes p38/42, während die beiden

sekretierten Proteine mit mAk 5.2. vergleichbar stark erkannt wurden. Entsprechende Inkubation mit mAk 12.10 lieferte keine Färbung der sekretierten Proteine. Das mag jedoch vor allem an der generell schwächeren Reaktion dieses Antikörpers liegen, die auch schon in der zellulären Fraktion zu beobachten war, und weniger an Unterschieden zwischen den zellulären und den sekretierten Formen der Proteine. Unterschiede in der Signalintensität zwischen sekretierten und verankerten Varianten der Proteine, betrachtet man die aufgetragenen Zellextrakte, waren erkennbar, können aber auch auf eine unterschiedliche Syntheserate der Proteine zurückzuführen sein.

mAK	Reaktivität mit P.f. MSP1	rMVA-msp1d/42S		rMVA-msp1d/42A		rMVA-msp1d/38+42S		rMVA-msp1d/38+42A	
		Zellen	Ü.-stand	Zellen	Ü.-stand	Zellen	Ü.-stand	Zellen	Ü.-stand
5.2	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	-
12.8	+++	+++	++	++	-	++	++	+	-
12.10	++	++	-	+	-	+	-	+	-

Tabelle 5.1: Reaktivität von monoklonalen Antikörpern mit rekombinanten Fragmenten aus MVA-infizierten HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit rekombinanten MVA infiziert, ÜN inkubiert und jeweils das Medium und die zelluläre Fraktion wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurden die getrennten Fraktionen mittels mAk 5.2, mAk 12.8 und mAk 12.10 als Erstantikörper und Ap-konjugiertem anti-Maus-IgG als Zweitantikörper analysiert.

5.3.4.4 Analyse der transienten Expression von *msp1d* in MVA-infizierten Zellen mittels „Northern blot“-Analyse

Die Syntheseeffizienz des Gesamt-MSP1D sowohl durch rekombinanten MVA als auch im transienten Ansatz lag weit unter der der C-terminalen Fragmente. Um nun herauszufinden, welche Ebene der Genexpression, d.h. transkriptionell oder translationell, für diese schwache Synthese verantwortlich ist, führte ich Northern blot-Analysen durch. Zu diesem Zweck wurden je zwei 10 cm Schalen BHK21-Zellen mit je 20 µg der Plasmide pIII_dHR.ssp/d-190-3, pIII_dHR.ssp/d-190-3,4 bzw. pIII_dHR.ssp/d-42-3 als positive Transkriptionskontrolle transfiziert. Drei Stunden später wurden diese Zellen mit einem MOI = 10 mit Wildtyp-MVA infiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Schale lediglich mit Viren infiziert aber nicht transfiziert. Je eine Schale wurde zwei Stunden nach der Infektion durch MVA in TRIzol geerntet, um einen möglichen Einfluss der frühen Genexpression auf dieses Phänomen zu untersuchen. Die abgelösten Zellen wurden anschließend bei -80°C eingefroren. Die Zellen der zweiten Schalen inkubierten ÜN bei 37°C und 6% CO₂ und wurden ebenfalls in TRIzol geerntet und bei -80°C eingefroren. Bei allen Ansätzen wurde anschließend wie unter 4.9.4 beschrieben die Gesamt-RNA aufgearbeitet.

Als Sonden für die Northern blot-Analyse diente einerseits ein DNA-Fragment, welches das 5' Ende der mRNA erkannte und ein weiteres, das an das 3' Ende hybridisierte. Die Sonde zur Erkennung des 3' Endes wurde durch Primer gewonnen, die *msp1d-19* amplifizieren (Sense-Primer: AIDA-sense; Antisense-Primer: AIDA-anti) und ein 315 bp langes DNA-Fragment

lieferten. Die Primer hybridisierten bei 60°C an das Template pZE21/d-H42*, und die PCR in Anwesenheit von Biotinmarkiertem dUTP durchlief 35 Zyklen. Die Sonde gegen das 5'Ende des *msp1d*-Gens wurde amplifiziert durch die Primer „83.sense.new“ (als Sense-Primer) und „83II.a“ (als Antisense-Primer). In diesem Fall hybridisierten die Primer bei 52°C an pZE21/d-H83, und die PCR lieferte ein 458 bp langes DNA-Fragment.

Jeweils 10µg Gesamt-RNA wurden über ein 0,8% MOPS-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und im ersten Schritt mit der 3'Sonde hybridisiert. Betrachtet man die RNA aus Zellen, die ÜN infiziert und transfiziert waren (Abb. 5.15, 3`Sonde, Spuren 5 – 8) so ist zu erkennen, dass das Signal gegen die mRNA, die zur Translation von *msp1d-42* führt, sehr viel stärker ist, als das Signal für die *msp1d*-mRNA. Da die Ansätze nicht mit DNase behandelt wurde, hybridisierte die Sonde auch an die transfizierten Vektoren, was als Kontrolle zum einen für die Hybridisierung, zum anderen für die Transfektion diente. Nachdem die erste Sonde entfernt worden war, wurde die transferierte RNA mit der Sonde gegen das 5'Ende hybridisiert. Hier zeigte sich im Fall der späten Transkription (Abb. 5.15, 5`Sonde, Spuren 5 – 8) nicht eine einheitlich, relativ scharfe Bande wie bei Hybridisierung mit der 3'Sonde, sondern das Signal wird sichtbar über Bereiche, die mRNA-Molekülen der Größe von ca. 1,5 kb bis auf über 5 kb entsprechen. Für die vollständige mRNA von *msp1d* war aber lediglich eine Bande von ca. 5 kb zu erwarten, wie sie durch die Sonde gegen das 3'Ende erkannt wurde. Das Signal in der Bahn für *msp1d-42* ist zurückzuführen auf die unvollständige Entfernung der ersten Sonde gegen das 3'Ende. Betrachtet man nun den Anteil an vollständigen Transkripten zum einen für *msp1d-42* und vergleicht ihn mit dem entsprechenden Signal für *msp1d*, so wird deutlich, dass die Menge an vollständiger *msp1d-42*-mRNA sehr viel größer ist als die Menge an Gesamtlänge *msp1d*-mRNA. Das führt letztlich auch zu einer geringeren Synthese von MSP1D.

Die RNA aus Zellen, die nach zwei Stunden geerntet wurden, hybridisierte mit keiner der beiden Sonden (Abb. 5.15, Spuren 1 – 4). Bis zwei Stunden nach der Infektion werden Gene unter Kontrolle von frühen Promotoren abgelesen. Diese frühe Transkription läuft im noch vorhandenen Virion ab, d.h. heterologe Gene, die im Fall der transienten Expressionsexperimente auf dem transfizierten Plasmid kodiert sind, werden nicht transkribiert und bleiben daher in der „Northernblot“-Analyse ohne Signal. Die als Negativkontrolle aufgetragene RNA aus Wildtyp-MVA-infizierten aber nicht transfizierten BHK21-Zellen hybridisiert mit keiner der beiden Sonden.

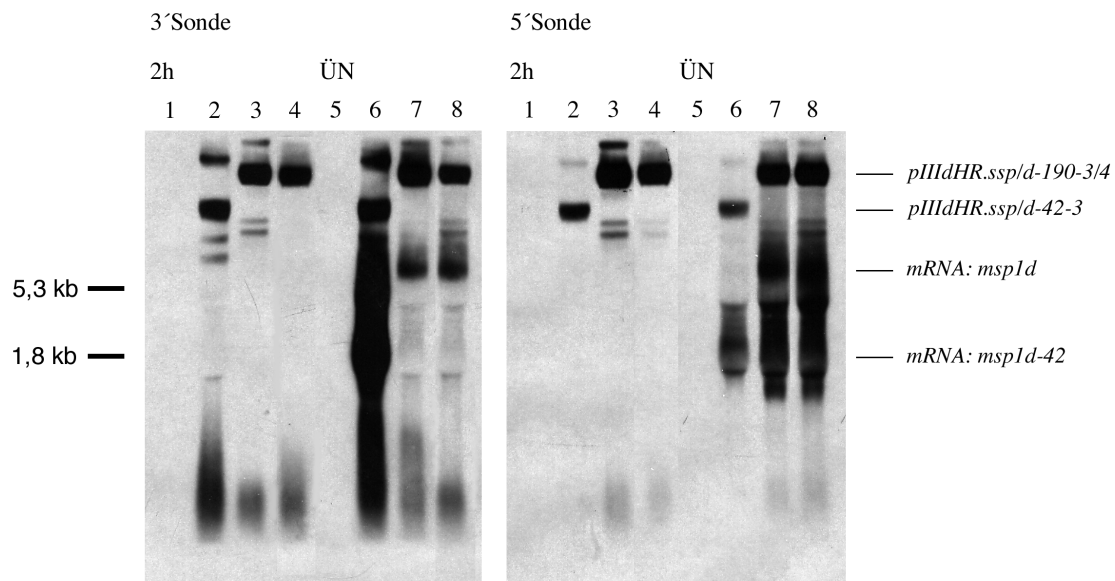


Abb. 5.15: Northernblot-Analyse der transienten Expression von MSP1D in BKH21-Zellen

Gesamt-RNA aus infizierten und mit Plasmid-DNA transfizierten BKH21- Zellen wurde über ein 0,8% Agarose Gel in 1x MOPS-Puffer und 2,2 M Formaldehyd aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit Biotin-konjugierten DNA-Sonden inkubiert.

Wird die RNA 2 h nach der Infektion durch Wildtyp-MVA isoliert, so hybridisiert sowohl die Sonde gegen das 3'Ende der *msp1d*-mRNA als auch die Sonde gegen das 5'Ende nur mit der transfizierten Plasmid DNA (jeweils Spur 1: nicht transfizierte BKH21-Zellen; Spur 2: *msp1d-42-3*; Spur 3: *msp1d-3*; Spur 4: *msp1d-3,4*). Da die frühe Transkription in MVA im noch intakten Virion direkt nach der Infektion stattfindet, entsteht keine mRNA der auf dem Plasmid kodierten und über MVA-Promotoren kontrollierten Gene. Hybridisiert man die RNA der späten Transkription mit der Sonde gegen das 3'Ende von *msp1d*, so sind die Signale der Gesamt-*msp1d*- mRNA schwach (Spur 7: *msp1d-3*; Spur 8: *msp1d-3,4*) verglichen zur Kontroll-mRNA von *msp1d-42* (Spur 6). Vor der Hybridisierung mit der Sonde gegen das 5'Ende von *msp1d* wurde die erste Sonde entfernt. Reste der ersten Sonde sind verantwortlich für das Signal von *msp1d-42* (Spur 6). Die Signale von *msp1d* (Spur 7 und 8) sind deutlich stärker im Vergleich zu den Signalen durch die Sonde gegen das 3'Ende. Die 5'Sonde detektiert u.a. jedoch mRNA, deren Größe geringer ist, als für die *msp1d*-mRNA erwartet, während die Sonde gegen das 3'Ende nur mit Transkripten > 5 kb hybridisiert. Der Anteil an vollständigen Transkripten von *msp1d-190* - > 5kb - (Spur: 7 und 8, 3'Sonde) ist deutlich niedriger als der von *msp1d-42* - > 1,4 kb (Spur: 6, 3'Sonde).

5.3.5 Aufreinigung von MSP1D-42 aus dem Medium rMVA-*msp1d/42S*-infizierter HeLa-Zellen

Natives MSP1 lässt sich über Immunitätschromatographie aufreinigen. Bei der in unserem Labor verwendeten Technik (modifiziert nach Siddiqui et al., 1987, beschrieben unter 4.10.1.2) erkennt der an eine feste Matrix gekoppelte monoklonale Antikörper 5.2 ein konformationelles Epitop am C-Terminus des Proteins und bindet es dadurch reversibel an das Säulenmaterial. Nachdem andere, nicht gebundene Proteine entfernt wurden, kann MSP1 mit Glyzin-Puffer bei niedrigem pH (pH 2,5) eluiert werden.

Werden HeLa-Zellen mit rMVA-msp1d/42S infiziert, so wird p42 auf Grund des Sekretionssignals in das Medium sekretiert (siehe Abb. 5.13: A). Besitzt das rekombinante MSP1D-Fragment im Bereich der Bindungsstelle von mAk 5.2 die native Konformation, so sollte es sich durch Bindung an den Antikörper aus dem Medium anreichern und reinigen lassen.

Zu diesem Zweck wurden vier 10 cm Schalen RK13-Zellen mit einer MOI = 0,5 infiziert, ÜN bei 37°C inkubiert, und anschließend das Medium gesammelt (40 ml). Nachdem es 10 min mit 1200 upm zentrifugiert wurde, um abgelöste Zellen zu entfernen, wurde das Medium bei 4°C gelagert und anschließend auf die Säule aufgetragen. Die Vorbereitung des Säulenmaterials wie auch die Chromatographie an sich sind unter 4.10.1 beschrieben.

Nach der Auftragung des Mediums wurde die Säule je einmal mit fünf Säulenvolumina TNET-Puffer, TNET+NaCl-Puffer und NET-Puffer gewaschen, und während der Elution mit Glyzin-Puffer pH 2,5 wurden 10 Aliquots von je 500 µl gesammelt und direkt durch Tris pH 8,0 neutralisiert. Ausgehend von dem neutralisierten Eluat wurden jeweils 20 µl mit 2x Probenauftragspuffer ohne reduzierende Agenzien gemischt, aufgeköcht und über eine 12% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Im Immunoblot (Abb. 5.16) sieht man eine deutliche Anreicherung von MSP1D-42 in den Fraktionen 5 bis 7, verglichen zum 42S-Medium, das nur ein sehr schwaches Signal liefert. Es fällt auf, dass MSP1D-42 zusätzlich während des abschließenden Waschschriffs (Fraktion 15) eluierte, obwohl die eigentliche Elution durch Glyzin-Puffer pH 2,5 bereits abgeschlossen war. Dieser Effekt wurde auch schon von Christina Schmid in unserem Labor bei der Aufreinigung von MSP1D-42 aus stabil transfizierten HeLa-Zellen beobachtet. Er kann lediglich durch eine Konformation des Proteins erklärt werden, die eine alternative Bindung des Proteins an die Säulenmatrix während der Aufreinigung bewirkt. Diese Bindung wird erst durch den pH-Wechsel von pH 2,5 auf pH 7,4 gelöst, möglicherweise durch eine weitere Konformationsänderung, und das Protein eluiert bei höherem pH in TNET-Puffer.

Die Coomassie-Färbung der Aufreinigung zeigte, dass der Großteil der Mediumsproteine im ersten Waschschriff vom gebundenen MSP1D-42 abgetrennt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Konzentrationen an rekombinantem Protein selbst ist jedoch gering. Für eine präparative Aufreinigung von MSP1D-42 mittels dieser Methode wären große Mengen an Medium von infizierten Zellen notwendig.

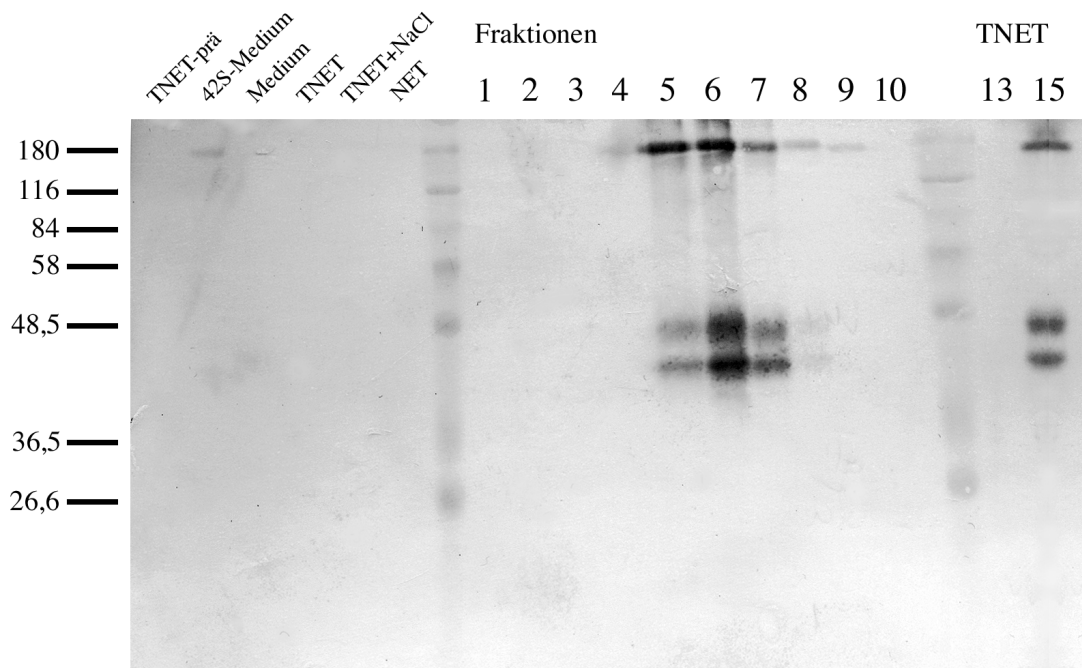


Abb. 5.16: Immunoblot-Analyse der Aufreinigung von MSP1D-42 aus dem Medium rMVA-msp1d/42S infizierten RK13-Zellen

MSP1D-42 aus 40 ml Überstand rMVA-msp1d/42S infizierter RK13-Zellen wurden über Immunaффinitätschromatographie mittels mAk 5.2 aufgereinigt. Jeweils 20 µl des Waschpuffers zur Äquilibration vor der Auftragung (TNET-prä), des aufgetragenen Mediums (42S-Medium), des Mediums nach dem Säulenauftrag und der Waschpuffer (TNET, TNET+NaCl, NET) wurden ebenso wie 20 µl der jeweiligen Eluatfraktionen (1 – 10) und zwei Proben aus der anschließenden Äquilibration (TNET: 13 und 15) unter nicht reduzierenden Bedingungen über 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mittels mAk 5.2 als Primärantikörper analysiert.

Rekombinantes MSP1D-42 band an die Immunaффinitätsmatrix (42S-Medium und Medium), blieb während der anschließenden Waschschriffe am Säulenmaterial (TNET, TNET+NaCl), NET), und wurde durch den pH-Wechsel auf pH 2,5 eluiert (Fraktionen 5 bis 7). Zusätzlich eluierte das rekombinante Protein in der abschließenden Äquilibration mit TNET. Dieser Effekt wurde auch schon früher beobachtet und könnte ein Hinweis auf eine alternative Bindung des Proteins an die Säulenmatrix sein, die erst durch die erfolgten pH-Wechsel labilisiert wurde.

Vergleicht man rekombinantes MSP1D-42 aus dem Überstand von MVA-infizierten Zellen mit rekombinantem MSP1D-H42 aus *E. coli*, so zeigte sekretiertes, in Säugerzellen synthetisiertes MSP1D-42 eine andere Mobilität als das Protein aus Prokaryoten (Abb.: 5.17). Trotz der zusätzlichen Aminosäuren durch den Histidin-Fortsatz, die das prokaryotisch synthetisierte p42 trug, erschien sekretiertes MSP1D-42 aus HeLa- oder RK13-Zellen größer. Dies ist in erster Linie auf die während der Passage durch den sekretorischen Weg angefügten Zuckerreste zurückzuführen. Alle aufgetragenen Proben zeigten zudem eine Multimerbande oberhalb des 116 kDa Markerproteins. Eine Doppelbande im Bereich zwischen 36,5 und 48,5 kDa färbte sich in drei der vier aufgetragenen Proben. Ausnahmen war das aus „Inclusion Bodies“ gereinigte und renaturierte Protein. Es erschien in einer Bande bei ungefähr 40 kDa. Bei den in Prokaryoten synthetisierten Proteinen kann die Doppelbande durch unterschiedliche Konformationszustände des Proteins im Bereich der Cysteine, d.h durch unterschiedliche Verknüpfung der Disulfidbrücken im p19 erklärt werden. Eventuell können

aber auch unterschiedliche Redoxzustände dieser Cysteinreste für das veränderte Laufverhalten verantwortlich sein.

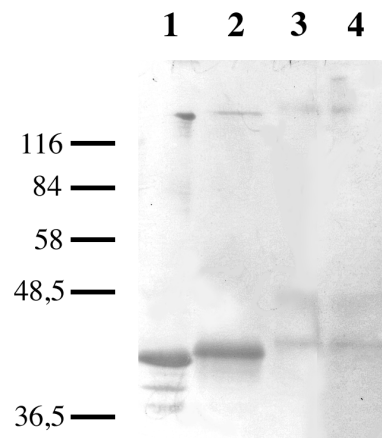


Abb. 5.17: Größenvergleich von rekombinatem MSP1D-42 aus unterschiedlichen Organismen

Rekombinantes MSP1D-42 wurde über eine 12%ige SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit mAk 5.2 als Erstantikörper inkubiert.

Die ersten beiden Spuren zeigen rekombinantes MSP1D-H42 aus Prokaryoten (Spur 1: MSP1D-H42 aus dem Überstand von „L-form“-*Proteus mirabilis*, bereit gestellt von Dr. Marian Kujau; Spur 2: aus „Inclusion Bodies“ gereinigtes und renaturiertes MSP1D-H42 aus *E. coli*, bereitgestellt von Christian Epp). In den beiden weiteren Spuren wurden sekretiertes MSP1D-42 aus Säugerzellen aufgetrennt (Spur 3: aufgereinigtes MSP1D-42 aus rMVA-*msp1d/42S* infizierten RK13-Zellen; Spur 4: MSP1D-42 gereinigt aus dem Überstand von stabil transfizierten HeLa-Zellen, bereitgestellt von Chistina Schmid)

5.4 Immunisierung von Mäusen mit MSP1D-42 und mit rekombinanten MVA-Stämmen

In diesen Experimenten wurde einerseits rMVA-*msp1d/42S* und rMVA-*msp1d/42A* und andererseits MSP1D-H42 als Protein aufgereinigt aus *E. coli*, eingesetzt. Die Präparate wurden einzeln und in Kombination appliziert um einen ersten Anhaltspunkt für ein mögliches zukünftiges Immunisierungsverfahren zu erhalten.

5.4.1. Humorale Immunantwort nach der Immunisierung mit rMVA-*msp1d/42S* und rMVA-*msp1d/42A*

Wie bei der Titerbestimmung wurden die zur Immunisierung eingesetzten Viren nach dem Auftauen ultrabeschallt, um eventuelle Aggregate zu lösen und eine homogene Virussuspension zu erhalten. Die so vereinzelteten Viren wurden anschließend in 10 mM Tris / 120 mM NaCl pH 7,4 auf den gewünschten Titer verdünnt. Vor der Erstimmunisierung wie auch vor jeder weiteren Injektion („Boost“) wurde den Mäusen jeweils ca. 100 µl Blut entnommen.

Jeweils 5 BALB/c Mäuse (6-8 Wochen alt) wurden je 10^6 IU rMVA-*msp1d/42S* bzw. rMVA-*msp1d/42A* intraperitoneal (i.p.) erstimmunisiert. Als Kontrollgruppe wurden weitere

fünf Mäuse mit der gleichen Menge Wildtyp-MVA infiziert. Zwei Folgeimmunisierungen („Boost“) wurden mit jeweils 10^8 IU drei Wochen und sechs Wochen nach der Erstimmunisierung durchgeführt. Drei und sieben Wochen nach der dritten Immunisierung wurde nochmals Blut entnommen. Um die Entwicklung der humoralen Immunantwort zu untersuchen, wurden die Seren der Mäuse mittels ELISA analysiert. Zu diesem Zweck wurden die 96-Loch Polystyrol-Platten mit rekombinantem MSP1D-HX42 (p42, das zwischen den N-terminalen Histidinresten und p42 eine Schnittstelle für den Faktor X trägt) aus *E. coli* beschichtet und anschließend mit verschiedenen Serumverdünnungen inkubiert.

Immunisierungen mit rMVA-msp1d/42S und rMVA-msp1d/42A

Drei Wochen nach der Erstimmunisierung war für beide Gruppen (rMVA-msp1d/42S und rMVA-msp1d/42A) keine signifikante Serokonversion erkennbar (Abb. 5.18: S1). Erst drei Wochen nach dem ersten Boost ließen sich signifikante Mengen an p42 spezifischen Antikörpern im Serum der Mäuse nachweisen, die mit rMVA-msp1d/42A immunisiert wurden (S2). Im ELISA ergaben 1:3200 verdünnte Seren aus der rMVA-msp1d/42A-Gruppe ähnliche Absorptionswerte, wie die unverdünnten Seren der rMVA-msp1d/42S-Gruppe. Die mit rMVA-msp1d/42S immunisierten Mäuse erreichten höhere Titer erst drei Wochen nach dem zweiten Boost (S3). Da die Titer im Falle der Immunisierung mit rMVA-msp1d/42A nach dem zweiten Boost nicht weiter anstiegen, wurde untersucht, inwieweit eine zusätzliche Immunisierung mit MSP1D-42 einen Einfluß auf die Entwicklung der humoralen Antwort hat. Daher wurden den Mäusen vier Wochen nach dem zweiten Boost jeweils 5 µg MSP1D-HX42, aufgereinigt aus *E. coli* in unkomplettem Freund'schem Adjuvans subcutan (s.c.) injiziert (S3). Dies führte aber nur bei einer Maus der rMVA-msp1d/42A-Gruppe (Maus #2) zu einer deutlichen Erhöhung des Antikörpertiters, der aber nach weiteren vier Wochen nicht mehr nachweisbar war (S4). Die Titer der restlichen vier Mäuse dieser Gruppe zeigten keine signifikanten Veränderungen und blieben bis zum Ende des Versuchs nach insgesamt 13 Wochen relativ konstant (S5). Dieser Boost mit Protein führte bei der RMVA-MSP1D/42S-immunisierten Gruppe zu einem Anstieg der Titer auf Werte, die denen der RMVA-MSP1D/42A-Gruppe gleich kamen. Der Kontrollgruppe (fünf Mäuse) wurden je drei mal Wildtyp-MVA und eine Emulsion aus NaPh/NaCl-Puffer in FIA gespritzt. Diese Tieren entwickelten keine meßbaren, p42-spezifischen Antikörpertiter.

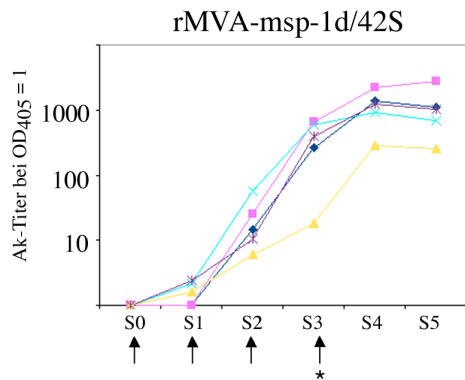
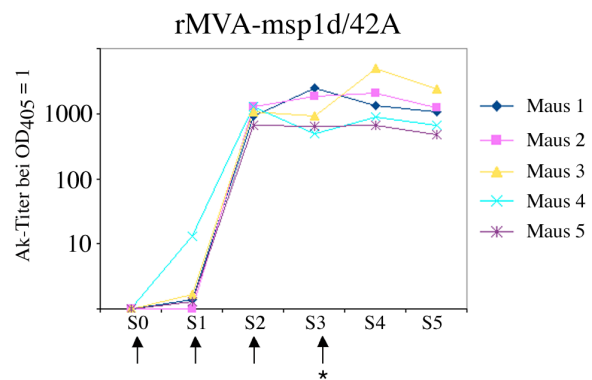
A**B**

Abb. 5.18: Entwicklung der humoralen Immunantwort nach drei Immunisierungen mit rMVA-*msp1d/42S* bzw. rMVA-*msp1d/42A* und einer Immunisierung mit MSP1D-HX42 aus *E. coli*

In **A** ist die Analyse der humoralen Immunantwort mittels ELISA mit MSP1D-HX42 als Antigen dargestellt. Die Kurven zeigen die p42 spezifische Antikörperentwicklung, gemessen an der $OD_{405} = 1$. Die Mäuse wurden jeweils im Abstand von drei Wochen mit 10^6 IU (Erstimmunisierung, zeitgleich mit der Blutentnahme S0) bzw. 10^8 IU (1. und 2. Boost, zeitgleich mit S1 und S2) rMVA-*msp1d/42S* immunisiert. Zusätzlich wurde den Mäusen nach weiteren vier Wochen je $5\mu\text{g}$ MSP1D-HX42 aus *E. coli* in FIA subcutan injiziert (eine Woche nach der Blutentnahme S3). S0 bis S5 stellen die Zeitpunkte der Blutentnahme dar, dabei wurde das Blut S0 bis S3 jeweils im Abstand von drei Wochen entnommen, die Entnahme von S4 und S5 erfolgte jeweils im Abstand von 4 Wochen. die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Immunisierungen. Der Stern markiert die vierte Immunisierung mit MSP1D-HX42 aus *E. coli*.

B zeigt die gleiche Analyse für die Immunisierung mit rMVA-*msp1d/42A*.

Immunisierungen mit Kombinationen aus rMVA-*msp1d/42S* und rMVA-*msp1d/42A*

Wie dargestellt, lösen rMVA-*msp1d/42S* und rMVA-*msp1d/42A* in Mäusen unterschiedlich starke humorale Immunantworten aus. Wie sich nun die Kombination beider Virustypen auf die humorale Immunantwort auswirkt, wurde im folgenden Versuch untersucht.

Jeweils 5 BALB/c Mäuse wurden mit 10^6 IU rMVA-*msp1d/42S* (Gruppe A) bzw. rMVA-*msp1d/42A* (Gruppe B) erstimmunisiert (Abb. 5.19: S0) und drei und sechs Wochen später mit 10^8 IU des entsprechend anderen rMVA-Typs infiziert (Gruppe A: rMVA-*msp1d/42A* bzw. Gruppe B: rMVA-*msp1d/42S*) (S1 und S2).

Ähnlich der Immunisierung ausschließlich mit rMVA-*msp1d/42A* konnte erst nach dem ersten Boost eine signifikante Serokonversion festgestellt werden (S2). Allerdings waren die gemessenen Antikörpertiter zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen zwei- bis dreimal höher als bei der Immunisierung mit rMVA-*msp1d/42A* allein. Die Titer stiegen durch den zweiten Boost weiter leicht an (S3) und blieben auch sieben Wochen nach dem zweiten Boost (S4) etwa zwei bis drei mal höher als bei der Immunisierung mit rekombinanten Viren eines Typs. Unterschiede zwischen den Gruppen A und B wurden im Mittel nicht festgestellt.

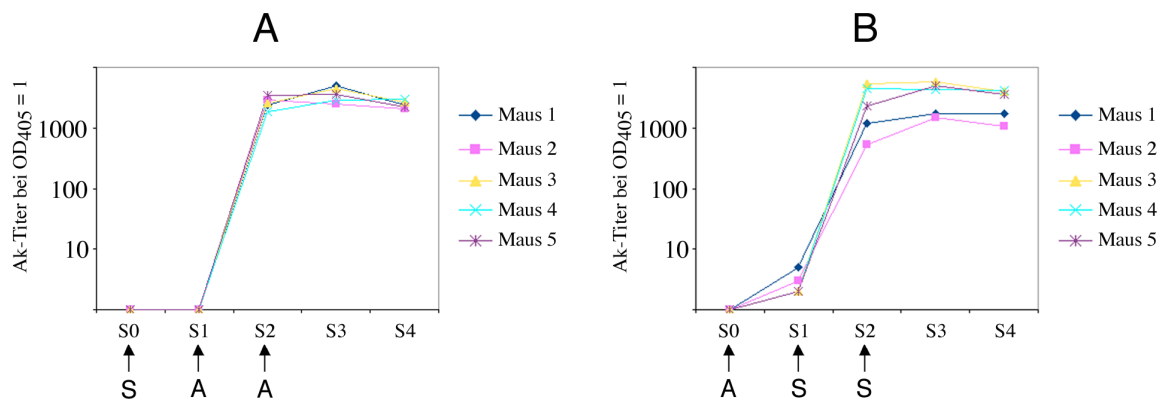


Abb. 5.19: Entwicklung der humoralen Immunantwort nach Immunisierungen mit Kombinationen aus rMVA-*msp1d/42S* und rMVA-*msp1d/42A*

Die Kurven zeigen die Entwicklung p42-spezifische Antikörpertiter gemessen an der OD₄₀₅ = 1 im ELISA gegen MSP1D-HX42 aus *E. coli*.

A zeigt die Entwicklung bei Ersimmunisierung mit 10⁶ IU rMVA-*msp1d/42S* (zeitgleich mit der Serumentnahme S0) und zweimaligem Boost mit je 10⁸ IU rMVA-*msp1d/42A* im Abstand von je 3 Wochen (S1 und S2) **B** bezieht sich auf das umgekehrte Immunisierungsprotokoll, das heißt Erstimmunisierung mit 10⁶ rMVA-*msp1d/42A* (S0) und zwei Wiederholungsimmunisierungen mit je 10⁸ rMVA-*msp1d/42A* (S1 und S2). Auch hier beschreiben S0 bis S4 die Zeitpunkte der Serumgewinnung jeweils im Abstand von drei Wochen, bzw. vier Wochen für S4, während die Pfeile die Immunisierungen markieren (parallel zu den Blutentnahmen S0, S1 und S2).

5.4.2 Humorale Immunantwort nach der Immunisierung mit rekombinantem MSP1D-HX42 aus *E. coli*

In einem weiteren Immunisierungsansatz wurde fünf BALB/c Mäusen je 5µg MSP1D-HX42 subcutan injiziert. Dabei war das Antigen zur Erstimmunisierung in komplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert, während es für die beiden folgenden Boosts in Form einer Emulsion in unkomplettem Freund'schem Adjuvans gespritzt wurde. Auch hier wurden die Mäuse mit je drei Wochen Abstand zwischen den Immunisierungsschritten geimpft, nachdem ihnen vorher Blut entnommen wurde.

Drei Wochen nach der Erstimmunisierung waren in den Seren von drei der fünf Mäuse (Abb. 5.20: Mäuse #1, #3, #5) signifikante Antikörper gegen p42 im ELISA messbar (S1). Bei allen fünf Mäusen stiegen die Titer im Laufe des Versuchs weiter an, und mit Ausnahme von Maus #2 entwickelten alle Mäuse im Verlauf des Versuchs hohe Antikörpertiter. Verglichen mit den Titern, die in den vorher beschriebenen Immunisierungsansätzen gemessen wurden, zeigten diese nur mit der Proteinpräparation immunisierten Tiere im Mittel die höchsten Antikörpertiter aller Ansätze. Die großen Unterschiede zwischen den Titern der einzelnen Mäuse sind wahrscheinlich auf eine teilweise Entmischung der injizierten Emulsion während der Erstimmunisierung zurückzuführen (der Versuch wird derzeit wiederholt).

Der Kontrollgruppe aus fünf Mäusen wurden je NaPh/NaCl-Puffer an Stelle von MSP1D-HX42 injiziert. Keine dieser Mäuse hatte meßbare Antikörpertiter gegen das Malariaprotein.

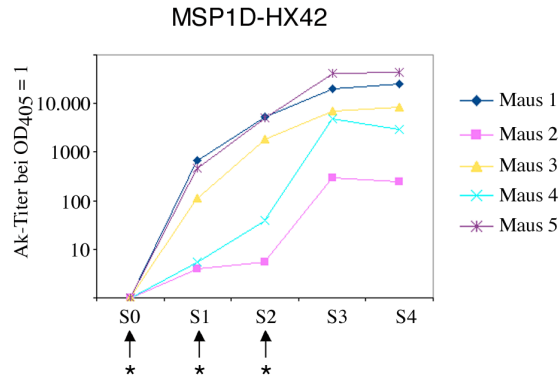


Abb. 5.20: Entwicklung der humoralen Immunantwort nach der Immunisierung mit MSP1D-HX42 aus *E.coli*

Dargestellt ist die Entwicklung der humoralen Immunantwort gegen MSP1D-HX42 nach der Immunisierung mit rekombinantem MSP1D-HX42 aus *E. coli*. Die Mäuse wurden im Abstand von je drei Wochen mit je 5µg MSP1D-HX42 in komplettem Freund'schem Adjuvans (Erstimmunisierung, S0) bzw. zweimal in unkompletten Freund'schem Adjuvans (Boost) s.c. immunisiert (S1 und S2). Die Zeitpunkte der Immunisierungen sind durch Pfeile mit Stern markiert und wurden parallel zur Gewinnung der Seren S0, S1 und S2 vorgenommen. Zusätzliche wurde drei und sieben Wochen nach der dritten Immunisierung Blut entnommen (S3 und S4).

5.4.3 Humorale Immunantwort nach der Immunisierung mit rMVA-*msp1d/42S* bzw. rMVA-*msp1d/42A* in Kombination mit rekombinantem MSP1D-HX42 aus *E. coli*

Immunisierung mit einer Kombination z.B. aus DNA oder virusähnlichen Partikeln zur Erstimmunisierung und rekombinanten MVA als Boost bewirkt eine signifikant höhere Immunogenität des verwendeten Antigens (Gilbert et al., 1999; Oliveira-Ferreira et al., 2000). Ob dies auch auf Kombinationen von rekombinanten MVA und MSP1D-Protein zutrifft, sollte im Folgenden untersucht werden.

MVA-Erstimmunisierung und Protein-Boost

In diesem Versuch wurden je Gruppe fünf Mäuse mit 10⁸ IU rMVA-*msp1d/42S* bzw. rMVA-*msp1d/42A* infiziert (Abb. 5.21: S0). Drei und sechs Wochen später wurde jeder Maus 5µg gereinigtes MSP1D-HX42 aus *E. coli* emulgiert in unkomplettem Freund'schem Adjuvans, subcutan injiziert (erster und zweiter Boost, S1 und S2).

Ein bis zwei Tage nach der ersten Impfung trat bei zwei Mäusen Fieber auf, das im Verlauf der nächsten ein bis zwei Tage wieder sank.

Nach dem ersten Boost mit MSP1D-HX42 stiegen in beiden Ansätzen die Antikörpertiter gegen p42 (S3). In beiden Fällen führte ein zweiter Boost mit dem Protein bei neun von zehn Mäusen zu höheren Titern, wobei diese bei acht von zehn Mäusen nach weiteren vier Wochen wieder zurück gingen (S4). Lediglich im Serum der Mäuse #5 und #2 der mit rMVA-

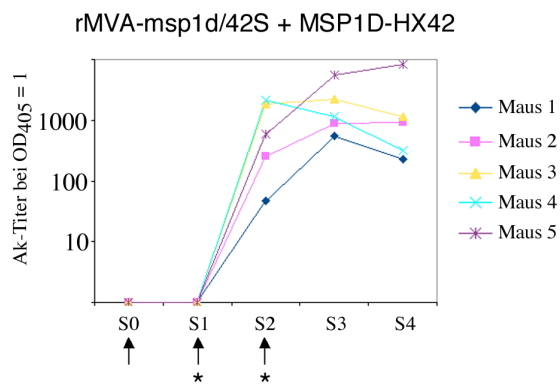
msp1d/42S erstimmunisierten Gruppe wurden auch sieben Wochen nach der letzten Immunisierung weiter steigende Antikörpertitern gemessen.

Vergleicht man die beiden Gruppe, so sind die Antikörpertiter der mit rMVA-msp1d/42A immunisierten Gruppe am Ende des Versuchs im Mittel doppelt so hoch, wie die Titer der mit rMVA-msp1d/42S-Gruppe (S4).

Der Kontrollgruppe, bestehend aus fünf Mäusen, wurden 10^8 IU Wildtyp bzw. NaPh/NaCl-Puffer in unkomplettem Freund'schen Adjuvans injiziert. Alle Kontrolltiere zeigten keine Reaktion gegen p42 im ELISA.

Zwei der 15 immunisiert Mäuse reagierten mit Fieber auf die Erstimmunisierung mit MVA, das nach zwei Tagen wieder sank.

A



B

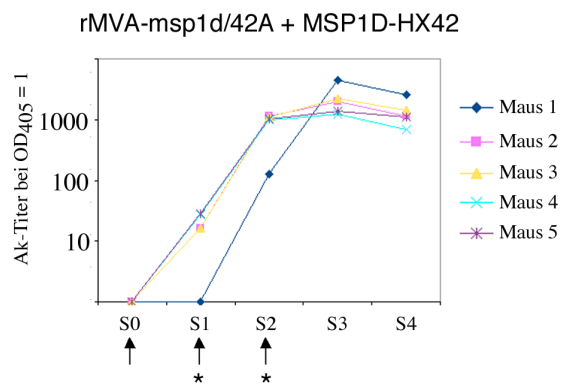


Abb. 5.21: Entwicklung der humoralen Immunantwort nach rMVA-Erstimmunisierung und MSP1D-HX42 Boost

Jeweils fünf Mäuse wurden mit 10^8 IU rMVA-msp1d/42S (A) bzw. rMVA-msp1d/42A (B) erstimmunisiert (zeitgleich zur Serumgewinnung S0) und nach drei bzw. sechs Wochen wurden ihnen jeweils $5\mu\text{g}$ MSP1D-HX42 in unkomplettem Freund'schen Adjuvans als erster und zweiter Boost s.c. injiziert (S1 und S2) (markiert durch die Pfeile, Protein-Injektionen durch einen Stern markiert). Jeweils vor den Immunisierungen (S0, S1 und S2) und drei und sieben Wochen nach dem zweiten Boost (S3 und S4) wurde Serum gewonnen.

p42 spezifische Antikörper im Serum wurden über ELISA ermittelt und die Antikörpertiter für die $\text{OD}_{405} = 1$ aufgetragen.

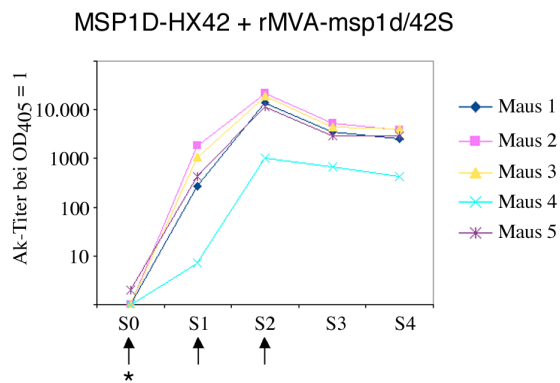
Protein-Erstimmunisierung und MVA-Boost

Wurden die BALB/c-Mäuse (fünf Tiere je Gruppe) zuerst mit je $5\mu\text{g}$ MSP1D-HX42 in komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert und nach drei und sechs Wochen mit je 10^8 IU rMVA-msp1d/42S bzw. rMVA-msp1d/42A infiziert, so wurde bereits nach der Erstimmunisierung eine Serokonversion festgestellt (Abb. 5.22: S1). Die Antikörpertiter stiegen drei Wochen nach dem ersten Boost mit rMVA verglichen zu den vorhergehenden Versuchen sehr stark an (S2), dabei führte ein erster Boost durch Infektion mit rMVA-msp1d/42A im Mittel zu doppelt so hohen Antikörpertitern wie die Infektion mit rMVA-msp1d/42S. Jedoch gingen die Titer gegen p42 in beiden Fällen bereits drei Wochen nach dem zweiten Boost, im Mittel auf ungefähr ein Fünftel zurück (S3). Diese Tendenz setzte sich in beiden Gruppen fort, die Titer blieben aber auch sieben Wochen nach der letzten

Immunisierung über denen der anderen Immunisierungen mit rekombinanten MVA. Lediglich Mäuse, die mit MSP1D-HX42 allein immunisiert wurden, zeigten 13 Wochen nach der Erstimmunisierung höhere p42-spezifische Antikörpertiter (Abb. 5.20: S4).

Die fünf Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit NaPh/NaCl-Puffer in komplettem Freund'schen Adjuvans und zweimal mit 10^8 IU Wildtyp-MVA immunisiert und zeigten keine Antikörperreaktion gegen p42.

A



B

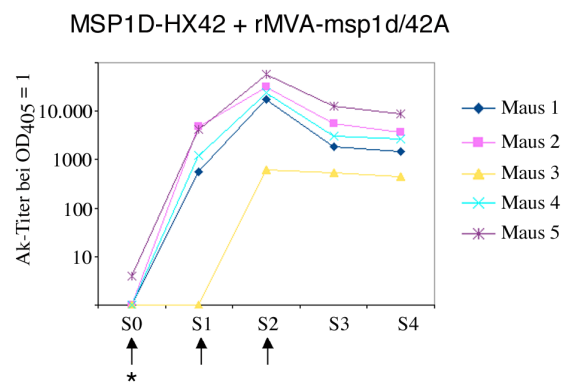


Abb. 5.22: Entwicklung der humoralen Immunantwort nach MSP1D-HX42-Erstimmunisierung und MVA-Boost

Zweimal fünf Mäuse wurden mit je $5\mu\text{g}$ MSP1D-HX42 aus *E. coli* in komplettem Freund'schen Adjuvans erstimmunisiert (parallel zur Blutentnahme S0). Drei und sechs Wochen später wurden sie mit je 10^8 IU rMVA-msp1d/42S (A) bzw. rMVA-msp1d/42A (B) infiziert (S1 und S2) (Injektionszeitpunkte dargestellt durch Pfeile, Protein-Infektion zusätzlich durch einen Stern). Jeweils vor den Injektionen (S0, S1 und S2) und drei und sieben Wochen nach der letzten Immunisierung wurde Blut entnommen (S3 und S4). Auch hier wurden die Titer als $\text{OD}_{405} = 1$ gemessen.

Um mögliche Antikörperreaktionen sowohl gegen die N-terminal angefügten sechs Histidinreste des rekombinanten MSP1D-HX42 aus *E. coli* als auch gegen mögliche *E. coli*-Verunreinigungen zu untersuchen, wurden Polystyrol-Platten mit MSP1D-HX30, ebenfalls gereinigt aus *E. coli*, beschichtet und die Seren der letzten beiden Gruppen (MVA-Erstimmunisierung und Protein-Boost bzw. Protein-Erstimmunisierung und MVA-Boost) analysiert. Dabei zeigte nur eine Maus aus der zweiten Gruppe (#4) einen geringen Antikörpertiter gegen das Antigen, wobei diese Antikörper auch schon im Präimmunserum nachweisbar waren, d.h. nicht durch die Immunisierung mit MSP1D-H42 induziert wurden (Daten nicht dargestellt).

5.4.4 Humorale Immunantwort gegen Wildtyp-MVA

Immunisiert man Mäuse mit rekombinanten MVA, so wird nicht nur eine Reaktion gegen das heterologe Antigen induziert, sondern auch eine Immunreaktion gegen den Trägerorganismus MVA. Um den humoralen Teil der gegen das Virus gerichteten Immunantwort zu untersuchen, wurden Versuche zur Invasionsinhibierung durch MVA-neutralisierende

Antikörper durchgeführt. Wie unter 4.12.4 beschrieben, wurden Wildtyp-MVA mit Seren der mit rMVA immunisierten Mäuse inkubiert und nachfolgend die *in vitro* Infektionsrate dieser Viren in Abhängigkeit von der Antikörperverdünnung bestimmt.

Die Serumverdünnung, bei der eine 50%ige Plaquereduktion beobachtet wird, dient in diesem Versuch als Parameter für die Titer der Antikörper, die spezifisch die Invasion von MVA in Wirtszellen hemmen. Als Kontrolle wurden Wildtyp-MVA mit den Präimmunseren in einer Verdünnung von 1:40 in PBS bzw. mit PBS ohne Serum inkubiert. Die Anzahl der Plaques, die durch die Infektion von BHK21-Zellen mit diesen Kontrollansätzen gezählt wurde, diente als Bezugswert (d.h. 100%) zur Berechnung der 50%igen Plaquereduktion. Sie war in beiden Kontrollen gleich.

Alle mit MVA immunisierten Mäuse in diesem Test entwickelten invasionsinhibierende Antikörper gegen MVA.

Die mittlere Verdünnung der Seren nach dem zweiten Boost, die zu einer 50%igen Invasionsreduktion führte, betrug im Falle der nur mit rekombinanten MVA immunisierten Mäuse 1:555, 1:530 in der Gruppe von Mäusen, die rMVA als Wiederholungsimmunisierung erhielten und für die Gruppe, die nur mit rMVA erstimmunisiert wurde 1:425. Unterschiede zwischen Seren der mit rMVA-msp1d/42A und rMVA-msp1d/42S immunisierten Mäuse wurden nicht gemessen.

5.4.5 Analyse der MSP1D-spezifischen Antikörper im Serum immunisierter Mäuse

Die Induktion der MSP1D-spezifischen Antikörper wurde ebenfalls mittels IFA an mit *P. falciparum* (3D7 Isolat) infizierten Erythrozyten analysiert (freundlicherweise bereit gestellt durch das Labor von Prof. M. Lanzer). Als Erstantikörper wurden die Seren aus Mäusen verwendet, die sowohl mit rMVA-msp1d/42S bzw. rMVA-msp1d/42A allein, als auch mit der Kombination aus rekombinanten MVA und rekombinantem MSP1D-H42 aus *E. coli* immunisiert wurden, gefolgt von Cy3-konjugiertem anti-Maus-IgG als Zweitantikörper. Sowohl Antikörper im Serum von Mäusen, die mit rMVA-msp1d/42S infiziert wurden, wie auch Antikörper im Serum der rMVA-msp1d/42A-immunisierten Mäuse erkannten natives MSP1 auf der Oberfläche der Parasiten, während das Protein von Antikörpern im Präimmunserum derselben Tiere bzw. der Mäuse in der Kontrollgruppe nicht gebunden wurde. Abbildung 5.23 zeigt exemplarisch die indirekte Immunfluoreszenz mit dem Serum einer mit rMVA-msp1d/42A infizierten Maus (#2), das drei Wochen nach dem zweiten Boost gewonnen wurde.

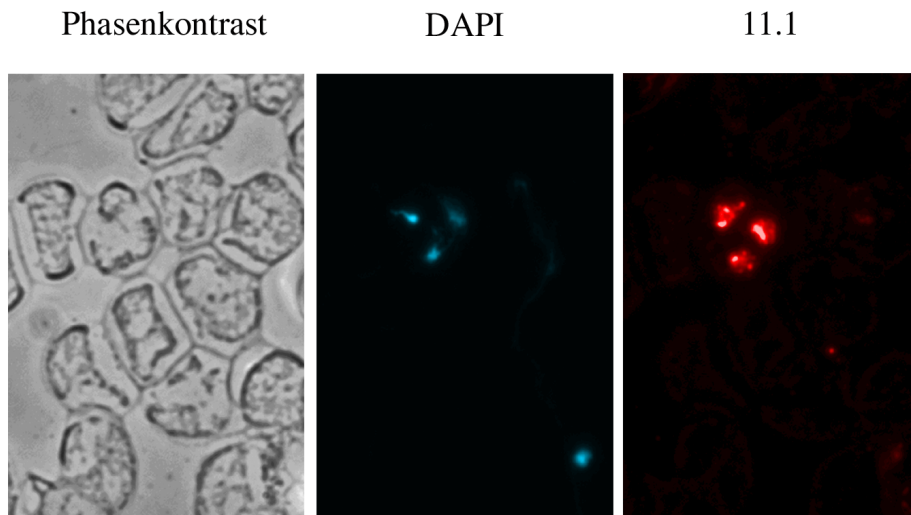


Abb. 5.23: Analyse der MSP1-spezifischen Antikörper im Serum immunisierter Mäuse

Die Induktion einer MSP1-spezifischen, humoralen Immunantwort wurde mittels IFA an *P. falciparum* (3D7) infizierten Erythrozyten untersucht.

Die Abbildung zeigt infizierte Erythrozyten, die mit dem Serum einer mit rMVA-msp1d/42A infizierten Maus inkubiert (#2) wurden. Die MSP1D-spezifischen Antikörper wurden durch Cy3-konjugiertes anti-Maus-IgG farblich markiert (Bild 11.1), und die intraerythrozytären Parasiten wurden durch DAPI-Färbung lokalisiert (DAPI).

6. DISKUSSION

Im Mittelpunkt der Malaria-Arbeit in unserem Labor steht die Frage, ob MSP1 aus *P. falciparum*, wenn als Impfstoff eingesetzt, eine schützenden Immunantwort hervorrufen kann. Darum verfolgen wir die Entwicklung eines experimentellen Impfstoffes, der aus zwei Komponenten besteht. Um eine spezifische, humorale Antwort auszulösen, soll MSP1 zum einen als Protein mit einem geeigneten Adjuvans eingesetzt werden. Zum anderen ist vorgesehen, MSP1-kodierenden DNA über hoch-attenuierte, virale Systeme zu übertragen und dadurch eine gute zelluläre Immunantwort hervorzurufen.

Da MSP1 in zwei prototypischen Formen vorkommt, muss sowohl das Protein als auch die virale Komponenten des Impfstoffs durch die beiden Prototypen repräsentiert werden. Ein Impfstoff solcher Komplexität ist natürlich nur geeignet, das grundsätzliche Potential von MSP1 herauszufinden, um abhängig vom Ausgang der Überprüfung gegebenenfalls in eine „technischen“ Impfstoffentwicklung einzutreten, die eine Vereinfachung des Impfstoffen zum Ziel haben wird.

Ein Voraussetzung für das Gesamtprojekt war die vollständigen Synthese der DNA-Sequenzen, welche die beiden Prototypen kodieren. Zu Beginn meiner Arbeit lag die ca. 5000 bp lange *msp1*-Sequenz des *P. falciparum*-Stamms FCB-1 vollständig vor, die Synthese der den zweiten Prototyp repräsentierenden Sequenz war jedoch noch nicht abgeschlossen.

Im ersten Teil meiner Arbeit wird daher die synthetische Sequenz (ebenfalls ca. 5000 bp) des 3D7-Stamms fertig gestellt und durch Sequenzierung und Expressionsanalysen in *E. coli* verifiziert.

Im zweiten Teil, der den Schwerpunkt meiner Arbeit darstellt, war es mein Ziel, rekombinanten Viren herzustellen, welchen eine der Gesamtsequenzen oder Teile derselben nach Infektion entsprechender Wirtszellen zu exprimieren vermögen. Hierbei konzentrierte ich mich auf *msp1d* (aus dem 3D7-Stamm). Als viralen Vektor nutzte ich das hochattenuierte modifizierte *Vaccinia* Virus Ankara (MVA), das mir durch Dr. G. Sutter, GSF, München, bereitgestellt wurde. Bei der Arbeit mit MVA profitierte ich sehr von der engen Kollaboration mit Dr. G. Sutter.

Im letzten teil meiner Arbeit habe ich damit begonnen, einige der rekombinanten MVA-Präparate in der Maus auf ihre Immunogenität hion zu untersuchen. Diese Studien konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr abgeschlossen werden.

6.1 MSP1 aus *P. falciparum*: Voraussetzungen für eine Analyse seiner Funktion und seinen Einsatz als Impfstoff

Sowohl für Funktionsuntersuchungen als auch für den Einsatz als Impfstoff müssen Proteine in guter Ausbeute, hoher Qualität und reproduzierbar herzustellen sein. Zwar läßt sich MSP1 aus Parasiten aufreinigen, allerdings ist dies nur im kleinen Maßstab unter großem Aufwand möglich und daher für die Gewinnung von MSP1 nach den oben genannten Kriterien auf diesem Weg nicht durchführbar.

Eine Alternative zur Aufreinigung des nativen Proteins besteht in der Herstellung von MSP1 in heterologen Systemen. Der hohe A+T-Gehalt des Genoms von *P. falciparum* aber machte es unmöglich, das ca. 5 kb große *mssl* stabil zu klonieren.

Erst die chemische Synthese des *mssl*-Gens vom K1-Prototyp (*mssl*) und damit die Reduktion des A+T-Gehalts in der kodierenden Sequenz durch W. Pan erlaubte die erfolgreiche Expression dieses Gens sowohl in *E. coli* als auch in eukaryotischen Zellen (Pan et al., 1999; Burghaus et al., 1999). Auf Grund der ausgedehnten, dimorphen Bereiche des Proteins war auch die Synthese von *mssl* des zweiten Prototyps (MAD20) notwendig. Zu diesem Zweck entwickelte I. Türbachova nach dem von R. Tolle, R. Mosbach und W. Pan entwickelten Prinzip eine DNA-Sequenz für das *mssl* aus dem Isolat 3D7. Auch dieser Sequenz lag die humanen Kodonhäufigkeit zugrunde, welche den A+T-Gehalt des Gens von ursprünglich 76% auf 54,6% senkte. Über synthetische, einzelsträngige Oligonukleotide erhielt man mittels asymmetrischer PCR doppelsträngige DNA-Fragmente (Dissertation I. Türbachova). Die den Prozessierungsprodukten des *mssld*-entsprechenden DNA-Stücke wurden in einem Schritt (p30, p29, p19), bzw. zwei (p38) oder drei Schritten (p83) hergestellt und kloniert. Das Zusammenfügen der einzelnen Fragmente zu der synthetischen Gesamtsequenz, die Überprüfung der Sequenz und die Modifikation des Gens für verschiedene Expressionssysteme war ein Teil meiner Disserations.

6.1.1 Perspektiven, die sich durch die Expression der synthetischen *mssl*-Gene eröffnen

Mit der Synthese ist es nun erstmals möglich, beide Prototypen von MSP1 in ihrer gesamten Länge heterolog und nach den oben genannten Kriterien herzustellen.

Beispielsweise die Herstellung der Proteine in Prokaryoten, die dabei mehrere Vorteile bietet: einerseits lassen sich Proteine in großen Mengen und hoher Qualität reproduzierbar herstellen, zum zweiten werden in Prokaryoten synthetisierte Proteine, wie Proteine in *Plasmodium* nicht glykosyliert (Berthe et al., 2000).

Dadurch eröffnen sich verschiedene, experimentelle Wege, die in unserer Gruppe verfolgt werden. Neben der Impfstoffentwicklung auf Basis von MSP1 untersuchen Christian Epp und Christian Kauth die Funktion des Proteins in Bezug auf Wechselwirkungen von Merozoiten und Erythrozyten durch Konkurrenzexperimente und die Invasionsinhibition durch Antikörper gegen die Fragmente von MSP1. Hinweise bezüglich der Struktur wird die Kristallstruktur des Proteins und seiner Fragmente liefern, ein Ziel, dass in Kollaboration mit Prof. K. Holmes und Dr. W. Kabsch am Max-Planck-Istitut für Medizinische Forschung in Heidelberg verfolgt wird, und für das hoch-reine Proteine in großen Mengen verfügbar sein müssen. Bisher konnte nur p19 aus *P. cynomolgi*, das im bakuloviralen System hergestellt wurde, kristallisiert werde (Chitarra et al., 1999). Auch die *in vitro* Reassoziaton von MSP1 aus seinen Fragmenten ist geplant und kann weitere Aufschlüsse zur Struktur des Proteinkomplexes liefern.

Im Rahmen der Entwicklung eines experimentellen Impfstoffs ist es nun möglich, das Gesamtprotein als Impfstoff einzusetzen, denn es gibt keine wissenschaftlichen Gründe zum

Ausschluß bestimmter Teile von MSP1. Bisher ist weder bekannt, welche Funktionen MSP1 im einzelnen übernimmt, noch welche Teile zu seiner Funktion beitragen. Betrachtet man die Größe und die Domänenstruktur von MSP1 sowie den für ein Oberflächenprotein eines Parasiten hohen Konservierungsgrad, so liegen Vermutungen nahe, dass es sich bei diesem Protein um ein multivalentes Protein handelt, dessen verschiedene Bereiche unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Untersuchungen, die sich mit verschiedenen Fragmenten von MSP1 befassen, legen nahe, dass viele Bereiche des Proteins zum Schutz gegen Malaria beitragen könnten. Antikörper, die MSP1-42 oder MSP1-19 binden und dadurch den zweiten Prozessierungsschritt verhindern, blockieren die Invasion der Merozoiten in Erythrozyten (Blackman et al., 1994, Uthapibull et al., 2001; O'Donnell et al., 2001). Aber auch Antikörpertiter gegen p83 zeigen eine positive Korrelation mit Schutz gegen Malaria (Tolle et al., 1993; Conway et al., 2000). Für MSP1-38 wird ein Einfluss auf die Bindung an Erythrozyten vermutet, allerdings konnte dieser Zusammenhang bisher nicht eindeutig bewiesen werden (Nikodem and Davidson, 2000).

Das Immunsystem kann auf vielfältige Art stimuliert werden. Die Applikation von MSP1 aufgereinigt aus heterologen Organismen stellt einen Weg dar, über den vornehmlich der humorale Zweig der Antwort angesprochen wird. Nun ist aus Immunisierungsversuche mit bestrahlten Sporozoiten bekannt, dass Epitope von MSP1 im Kontext von MHC Klasse I Molekülen auf der Oberfläche von infizierten Hepatozyten präsentiert werden (Krzych et al., 1995). Das macht die infizierten Leberzellen zum potentiellen Ziel einer zytotoxischen T-Zell-Antwort. Um sowohl die humorale Immunantwort als auch den zellulären Zweig zu stimulieren, sind zusätzlich zu Versuchen mit gereinigtem MSP1 Immunisierungen mit rekombinanten Viren sinnvoll, ein Ziel, dass in dieser Arbeit in Kollaboration mit Dr. G. Sutter an der Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit (GSF) in München durch die Etablierung rekombinanter MVA verfolgt wird. Aber auch rekombinante Masern-Viren auf Basis des Impfstamms Edmiston-B, die das Gesamt-Gen tragen, wie auch Viren, die *mSP1d-42* exprimieren, werden in Kollaboration mit Dr. L. Martin im Labor von Prof. M. Billeter in Zürich hergestellt.

Durch die Synthese von *mSP1* des 3D7-Isolat werden nun neben Versuchen an Affen – sie werden nur mit Parasiten des FCB-1-Stamms infiziert – auch Immunisierungen an Menschen möglich, da Human-Versuche nur mit Erregern des 3D7-Typs durchgeführt werden (dieser Stamm weist keine Restistenzen gegen Anti-Malaria-Mittel auf). So sind in Zusammenarbeit mit dem Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) in Bethesda, USA und mit Prof. Knobloch am Tropeninstitut in Tübingen Immunisierungsstudien an Menschen geplant, bei dem nach GMP-Verfahren hergestelltes, rekombinantes Material eingesetzt wird.

In Hinblick auf den Einsatz als Impfstoff wird die Verfügbarkeit beider Prototypen es in Zukunft zudem erlauben, sowohl homologe als auch heterologe Immunisierungs- und Infektionsversuche durchzuführen.

6.2 MSP1D kann in Prokaryoten hergestellt werden

Zur Expression von *mSP1d* in Prokaryoten wurde das Gesamtgen bzw. die Fragmente in prokaryotische Expressionsvektoren der von Rolf Lutz entwickelten pZ-Serie umkloniert (Lutz *et al.*, 1998). Nachdem die *P. falciparum*-Signalsequenzen des C- und N-Terminus entfernt wurden, konnte ich die MSP-1D-Fragmente p83, p42 und p19, die Fusionen aus p83/30 und p38/42 wie auch das Gesamtprotein als Fusionen an sechs N-terminale Histidinreste unter Kontrolle des Promotors $P_{\text{LtetO-1}}$ im Zytoplasma von *E. coli*-Zellen herstellen. Aber weder die Coomassie-Färbung des Gesamtzellextrakts noch der Immunoblot zeigte eine Expression der Fragmente p30 und p38. Dies hängt möglicherweise mit Sekundärstrukturen der mRNA dieser Fragmente zusammen, welche die Translation beeinträchtigen. Erst die Modifikationen der Expressionsvektoren durch Rolf Lutz, Christian Epp und Christian Kauth, wie die Einführung einer Faktor X-Schnittstelle zwischen die N-terminalen sechs Histidine und der für MSP1D-kodierenden Sequenz und dem Austausch des Promotors $P_{\text{LtetO-1}}$ gegen P_{A1LacO1} erlaubten die kontrollierte Expression sämtlicher Fragmente nach Induktion mit IPTG. Andere Fusionsproteine, z.B. sechs Histidine am C-Terminus oder Fusionen an GST ermöglichen nun eine effektive Aufreinigung der rekombinanten Malaria-Proteine und die Herstellung des Gesamtproteins unter GMP-Bedingungen eine Voraussetzung für die Überprüfung von MSP1 als Impfstoff für den Menschen.

Durch die bakteriellen Expressionssysteme können die rekombinanten Malaria-Proteine in großen Mengen hergestellt werden. Allerdings ist aus Gründen, wie z.B. die Ausbildung von unterschiedlichen Disulfid-Brücken, nicht sicher, ob die rekombinant hergestellten Proteinen in der nativen Faltung vorliegen. Außerdem aggregieren einige Proteine bei Überexpression in *E. coli* in sogenannten „Inclusion Bodies“, was eine Denaturierung und anschließende Neufaltung des Proteins notwendig macht.

6.2.1 Der Versuch, MSP1 in „L-Form“-Bakterien herzustellen

Als eine Möglichkeit, diese Aggregation der Proteine, die unter anderem durch eine hohe intrazelluläre Konzentration begünstigt wird, zu vermeiden und trotzdem in einem prokaryotischen System zu verbleiben erschien uns die Verwendung von „L-Form“-Bakterien. Diese Bakterien haben durch langanhaltenden Selektion mit Penicillin die Fähigkeit zur Ausbildung einer Zellwand und damit auch eines Periplasmas verloren (Gumpert and Taubeneck, 1983). In diesen Zellen werden Proteine, die normalerweise in das Periplasma exportiert werden, stattdessen direkt in das Kulturmedium sekretiert und könne anschließend aus diesem extrahiert werden.

In Zusammenarbeit mit Dr. Marian Kujau am Institut für Molekulare Biotechnologie (IMB) in Jena konnten wir zeigen, dass die Fusion der MSP1-Fragmente an das Signalpeptid des *E. coli*-Proteins *ompA* zur Sekretion der Malaria-Proteine in das Medium transfizierter „L-Form“ *Proteus mirabilis* führte. Die exportierten Proteine wurden im Immunoblot als homogene Bande angefärbt und zeigten im Vergleich zu im *E. coli* Zytoplasma synthetisierten MSP1D kaum Degradation. Zudem konnte Dr. M. Kujau die sekretierten Proteine sowohl

über eine Immunaффinitätschromatographie mit mAk 5.2 als auch über Nickel-Chelat-Chromatographie aus dem Medium extrahieren. MSP1F aus „L-Form“ *Proteus mirabilis* reagierte mit verschiedenen MSP1-spezifischen, monoklonalen Antikörpern, einige davon sind gegen konformationelle Epitope gerichtet, was darauf schließen läßt, dass die rekombinanten Proteine in den gebundenen Bereichen die native Konformation besaßen. Trotz dieser grundsätzlich positiven und interessanten Ergebnisse scheiterte das „L-Form“-Projekt, da sich die rekombinanten Stämme als instabil erwiesen und eine Kultivierung in größerem Maßstab unmöglich machten.

6.2.2 Die Synthese der C-terminalen MSP1D-Fragmente in Prokaryoten führt zu unterschiedlichen Konformationen der Proteine

Die Immunoblot-Analysen der Zelllysate von *E. coli*, die *msp1d-19*, *msp1d-42* und die Fusion aus *msp1d-38* und *msp1d-42* exprimierten mit mAk 5.2 zeigten in allen Fällen ein reproduzierbares Bandenmuster aus Proteinen, die ein unterschiedliches Laufverhalten in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufwiesen.

MSP1-19, das als Fusion an das Signalpeptid aus *ompA* durch *E. coli* hergestellt wurde, zeigt zwei Banden, eine entsprach etwa 14 kDa, während die andere auf der Höhe von Proteinen der Größe von ca. 25 kDa zu finden war. Dabei kann es sich um kompakt gefaltete Dimere handeln, aber wahrscheinlicher sich unterschiedliche Konformationen des Proteins, die zu unterschiedlichem Laufverhalten führen. Anthony Stowers zeigte in mehreren Versuchen, dass rekombinantes MSP1-19 aus *Saccharomyces cerevisiae* unterschiedliche Konformationen ausweist, was zu einer ähnlichen Trennung in der Polyacrylamid-Elektrophorese führte. So wurde von ihm postuliert, dass p19 mit nativ-gefalteten EGF-Domänen durch eine sehr kompakte Faltung schlecht durch SDS gebunden wird, geringer geladen ist und daher langsamer im elektrischen Feld läuft (Stowers et al., 2001).

MSP1D-42 aus *E. coli* trat in Form einer Doppelbanden auf. Die für p19 diskutierte, unterschiedlich kompakte Faltung der EGF-ähnlichen Domänen könnte hier für die unterschiedliche Auftrennung verantwortlich sein.

Wurde die Fusion von p38 und p42 analysiert, so erkannte mAk 5.2 ebenfalls zwei Proteine unterschiedlicher Laufhöhe. Kalkuliert man die den Banden entsprechenden Molekulargewichte, so entspricht die untere Bande dem Monomer und die obere möglicherweise einem sehr kompakten Dimer. Es ist unwahrscheinlich, dass auch hier die für SDS unterschiedlich zugängliche Domänen am C-Terminus für ein derart unterschiedliches Trennverhalten im elektrischen Feld verantwortlich sind.

6.3 MVA als Trägerorganismus für MSP1

Im zweiten Teil der Arbeit verfolgte ich den Ansatz, das hochattenuierte *Modifizierte Vaccinia-Virus Ankara* (MVA) als Trägerorganismus für *msp1* zu etablieren und charakterisieren.

MVA entstammt dem als Humanimpfstoff eingesetzten Dermovaccinia-Virus CVA, das durch mehr als 570 Passagen über Hühner-Embryo-Fibroblasten seine Virulenz, nicht aber seine immunogenen Eigenschaften im Menschen und in vielen Tieren verloren hat (Mayr et al., 1978; Blanchard et al., 1998). Nicht nur durch den Einsatz während des Pocken-Ausrottungsprogramms, 120.000 Menschen darunter immunsupprimierte Personen wurden mit MVA immunisiert (Stickl et al., 1974), sondern auch durch zahlreiche Versuche als Träger für fremde Antigene (Amara et al., 2001, Moss et al., 1984; Scholl et al., 2000), gilt MVA als sehr gut charakterisiertes und sehr sicheres Impf-Virus. Das Ausgangsvirus CVA verlor während der Attenuierung zu MVA mehr als 30 kb seiner genomischen DNA wodurch große Mengen an Fremd-DNA in das Virus-Genom integriert werden können (zur Übersicht: Rolph and Ramshaw, 1997).

Neben MVA gibt es weitere attenuierte *Vaccinia*-Viren: Das Virus NYVAC entstammt ursprünglich dem Coppenhagen-Stamm und wurde durch die gezielte Deletion von 18 offenen Leserastern attenuiert. Ebenso wie bei ALVAC, einem Kanarien-Pockenvirus, ist bei NYVAC in Säugerzellen die DNA-Replikation blockiert (Tartaglia et al., 1992), während bei MVA die Virusassemblierung unterbunden wird. Das bedeutet, die späte Genexpression findet in NYVAC und ALVAC im Gegensatz zu MVA nicht statt, was sich auch in Unterschieden bezüglich der Immunreaktion auf diese Viren im Vergleich zu MVA und Viren des Western Reserve-Stamms widerspiegelt (Schneider et al., 1998). MVA kann daher sowohl während der frühen Transkriptionsphase eine zytotoxische T-Zell-Antwort induzieren als auch den humorale Zweig der Immunantwort durch die hohe Protein-Expression während der späten Phase stimulieren.

Die Generation rekombinanter MVA beruht auf der hohen Rekombinationsrate des Virussgenoms während der Replikation in der Wirtszelle (Staib et al., 2000). Rekombination kann stattfinden zwischen der genomischen DNA zweier Viren, z.B. im Bereich der terminalen Sequenzen, was unterschiedlich lange Tandem-Wiederholungen im Bereich der Genom-Enden zur Folge hat. Sie findet aber auch statt zwischen der genomischen Virus-DNA und gleichzeitig transfizierter Plasmid-DNA, die zur Virus-DNA homologe Sequenzen trägt. Das wird im ersten Schritt bei der Herstellung rekombinanter Viren genutzt (zur Übersicht: Moss et al., 1996). Im zweiten Schritt nutzt man diese hohe Rekombinationsrate um DNA-Stücken, die durch gleichorientierte DNA-Sequenz-Wiederholungen flankiert sind - z.B. das Selektionsgen *k11* - aus dem Genom zu entfernen. Zu sehen ist diese interne Rekombination schon während der Passagen der rekombinanten Virus-Ansätze über RK13-Zellen.

So nützlich die hohe Rekombinationsrate ist, sie birgt auch die Gefahr, dass heterologe Gene, wenn sie Sequenz-Wiederholungen auf der DNA-Ebene tragen, nicht stabil im Vaccinia-Virus-Genom propagiert werden können. Zudem kann die DNA rekombinanter Viren untereinander oder mit noch vorhandener, genomischer Wildtyp-MVA-DNA rekombinieren, z.B. mit fragmentierten Resten des authentischen *k11*. Daher ist es wichtig, während der fortlaufenden Passage und Selektion über RK13-Zellen, Qualitätskontrollen in Form von Immunoblot-Analysen, Immunperoxidase-Färbungen oder PCR-Analysen durchzuführen. Je weiter die Passagen fortschreiten und je weniger Wildtyp-MVA-Reste vorhanden sind, desto geringer wird die Gefahr der Rekombination der rekombinanten MVA mit dem Wildtyp-Genom.

Unsere Entscheidung, MSP1 im Zusammenhang mit rekombinanten MVA sowohl als sekretiertes als auch als oberflächenverankertes Protein herzustellen, beruht auf der Beobachtung, dass ein oberflächenverankertes Protein eine stärkere humorale Immunantwort auslöst, als ein Protein, das im Cytoplasma der Zelle bleibt (Yang et al., 1997) oder sekretiert wird (Langford et al., 1986). Um diese Beobachtung in Bezug auf MSP1 zu untersuchen, wurden Ansätze verfolgt, die sowohl die Sekretion als auch Oberflächenverankerung von MSP1 zum Ziel hatten.

6.3.1 Herstellung und Charakterisierung rekombinanter MVA, die *msp1d* exprimieren

Die Signal- und Anker-Sequenzen aus *P. falciparum* werden bei Expression in Säuger-Zellen nicht erkannt, bzw. nicht korrekt prozessiert (Moran and Caras, 1994; Burghaus et al., 1999, Yang et al., 1997). Das Problem konnte gelöst werden durch die Verwendung der Signalsequenzen des humanen „Decay-Accelerating-Factors“ (DAF), wie bei Burghaus et al. beschrieben. Daher habe ich in meinem Projekt ebenfalls die Sequenzen aus *P. falciparum* durch die Signale aus DAF ersetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden rekombinante MVA untersucht, welche die synthetischen Sequenzen von *msp1d-42*, *msp1d-38/42* wie auch das Gesamt-*msp1d* in ihrem Genom tragen. Während der Passagen sowohl über RK13-Zellen, als auch über BHK21-Zellen wurde deutlich, dass es sich bei den in dieser Arbeit besprochenen, rekombinanten MVA um sehr stabile Viren handelt. Sie zeigen auch nach 20 Passagen und anschließender Amplifikation in BHK21-Zellen eine stabile Expression der integrierten, chimären *msp1d*-Sequenzen.

In rekombinanten MVA wurden MSP1D-42 und MSP1D-38/42 im Vergleich zum Gesamt-MSP1D sehr viel effizienter synthetisiert. Um den verantwortlichen Mechanismus zu untersuchen, führte ich Northernblot-Analysen durch. *msp1d*-spezifische Sonden erkannten RNA aus infizierten BHK21-Zellen, die *msp1d-42* oder Gesamt-*msp1d* exprimierten über Bereiche von 1,5 bis über 5 kb. Das hängt mit der *Vaccinia*-Virus-spezifischen Transkription zusammen: während der späten Transkription durch die *Vaccinia*-eigene RNA-Polymerase entstehen mRNAs ohne definiertes 3' Ende, d.h. die Transkripte eines jeden Gens unterscheiden sich sehr stark in ihrer Länge (Moss, 1990, Moss et al., 1996).

Geht man von einer ähnlichen mRNA-Menge aus, ist der Anteil an Transkripten, welche die vollständige *msp1d*-Sequenz tragen (≥ 5 kb) geringer als der Anteil vollständiger *msp1d-42*-Transkripte ($\geq 1,4$ kb), was letztlich den Unterschiede in den Proteinmengen erklärt.

Auf Grund der sehr viel höheren Proteinsyntheseeffizienz konzentrierte ich mich in dieser Arbeit auf rekombinante MVA, die *msp1d-42* oder *msp1d-38/42* exprimieren. Aber auch die Generation von rekombinanten MVA, welche das ganze, synthetische Gen tragen, wurde zu einem späteren Zeitpunkt zusammen mit Dr. Miao Jun fortgesetzt. Ein Alternativweg, den gesamten kodierenden Bereich von *msp1* in ein Virus zu integrieren und eine höhere Expressionrate zu erzielen, wird ebenfalls von uns verfolgt: Dr. Miao Jun integrierte *msp1d-83/30* in die Deletion VI von rMVA-*msp1d/38+42A*, so dass beide Hälften von *msp1d* getrennt exprimiert werden.

6.3.2 Charakterisierung von MSP1D-42 und MSP1D-38/42 aus rMVA-infizierten Zellen

Wie in Immunoblot-Analysen und indirekten Immunfluoreszenzen deutlich wurde, führte die Fusion von MSP1D-42 und MSP1D-38/42 an das DAF-Sekretionssignal dazu, dass die Proteine in das Medium sekretiert wurden. Die MSP1-Fragmente ließen sich in der infizierten und permeabilisierten HeLa-Zelle mit dem ER-Protein Sec61 β kolokalisieren. Beides deutet darauf hin, dass die rekombinanten Proteine korrekt in den sekretorischen Weg dirigiert wurden. Auch das Fusionprotein aus DAF-Sekretionssequenz, MSP1D-42 bzw. 38/42 und DAF-GPI-Ankersequenz konnte mit dem ER-Marker kolokalisiert werden, wurde aber in Folge nicht in das Medium exportiert, sondern auf der Plasmamembran-Außenseite verankert. Schon in früheren Versuchen konnte P. Burghaus durch die Behandlung mit Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C zeigen, dass MSP1F, das mit der DAF-Sekretions- und Ankersequenz versehen war, über den im ER angefügten, vorsynthetisierten GPI in der Plasmamembran verankert wurde (Burghaus et al., 1999).

MSP1D-42 aus rMVA infizierten Zellen wurde nach der Auftrennung unter nicht reduzierenden Bedingungen in Immunoblot-Analysen mit verschiedenen p42-spezifischen Antikörpern als Erstantikörper nie als singuläre Bande angefärbt, sondern in Form zweier, diffuser Doppelbande von ca. 40 - 50 kDa und 120 – 150 kDa. Wie durch Immunoblotanalyse der nicht reduzierten im Vergleich zu den reduzierten Proteinen gezeigt werden konnte, ist die Doppelbanden-Struktur bei 40 – 50 kDa auf unterschiedlichen Glykosylierungszustände von p42 in Kombination mit einer kompakten Faltung durch intramolekulare Disulfide zurückzuführen, während die Doppelbanden bei 120 – 150 kDa durch intermolekulare Disulfidbrücken zustande kommen (Abb. 5.14, B).

Auch rMVA-synthetisiertes MSP1D-38/42 zeigte ein heterogenes Laufverhalten: es wurde meist in Form von zwei Banden nachgewiesen. Der Laufhöhe nach zu urteilen handelt es sich dabei um unterschiedlich stark glykosylierte Formen des heterolog hergestellten Proteins, da die Bande von ca. 116 kDa auch nach der Reduktion der Disulfidbrücken ebenfalls erhalten bleibt.

Der monoklonale Antikörper 5.2 erkennt ein konformationelles Epitop, das durch die Verknüpfung von Cysteinen zu einer EGF-ähnlichen Domäne gebildet wird. Die Bindung durch diesen Antikörpern zeigt, dass die rekombinanten Proteine in diesem Bereich dem nativen MSP1 entsprechend gefaltet sind. Immunoblots mit den monoklonalen Antikörpern 12.8 und 12.10 bestätigten diese Beobachtung. Auch diese Antikörper erkannten die rekombinant hergestellten Proteine. Dabei reagierte mAk 12.10 bei gleicher Verdünnung schwächer mit den verankerten Versionen der MSP1D-Fragmente als mAk 12.8. Allerdings bindet mAk 12.10 auch das native MSP1 bei gleicher Verdünnung schwächer als mAk 12.8. Sekretiertes MSP1D-42 und MSP1D-38/42 wurde bei einer Verdünnung von 1:1000 hingegen nicht durch mAk 12.10 erkannt, was unter Umständen ebenfalls an der niedrigen Antikörperkonzentration liegen kann. Versuche bei höherer Antikörperkonzentration wurden auf Grund nur sehr begrenzt vorhandenen Antikörpermengen nicht durchgeführt. Andererseits kann die verminderte Bindung von mAk 12.10 auch durch eine Strukturveränderung durch N-Glykosylierung nahe der zweiten EGF-ähnlichen Domäne bedingt sein. mAk 5.2 und mAk 12.8 binden an die EGF-ähnliche Domäne 1, während mAk 12.10 beide EGF-ähnlichen

Domänen zur Bindung benötigt (Uthaipibull et al., 2001). Ob nun die geringe Antikörpermenge oder eine falsche Konformation der zweiten EGF-ähnlichen Domäne für das Ausbleiben eines Signals verantwortlich sind, kann hier nicht beantwortet werden.

Proteine aus MVA-infizierten Zellen sind entsprechend ihrer Aminosäuresequenz glykosyliert. Auch bei der Synthese von MSP1D-42, MSP1D-38/42 und Gesamt-MSP1D durch rekombinante MVA war eine verminderte Mobilität der Proteine im Vergleich zu den in *E. coli* hergestellten Fragmenten zu sehen, dabei wurden die Unterschiede mit ansteigender Zahl der potentiellen N-Glykosylierungsstellen größer (p42: 1 Glykosylierungsstelle; p38/42: 5, p190: 14). P. Burghaus konnte durch Behandlung mit Glykosidasen zeigen, dass diese Stellen im Fall des heterolog synthetisierten MSP1F in HeLa-Zellen glykosyliert werden (Burghaus et al., 1999). Einerseits ist bekannt, dass die Glykosylierung die immunogenen Eigenschaften von Proteinen verändern (zur Übersicht: Rudd et al., 2001). Andererseits geht die Mutation der Stellen mit der Veränderung der Aminosäuresequenz einher, und könnte zudem bewirken, dass das zu exportierende Protein nicht mehr effizient sekretiert wird (Helenius and Aebi, 2001).

Einige Immunoblots von Zellextrakten mit rMVA-*msp1d/42A* oder rMVA-*msp1d/38+42A* infizierter Zellen, die mit mAk 5.2 als Erstantikörper inkubiert wurden, zeigten neben den oben beschriebenen noch weitere, diffuse Banden von 20 - 30 kDa, die im Fall der Infektion mit rMVA-*msp1d/42S* oder rMVA-*msp1d/38+42S* nicht nachgewiesen wurde. Ähnliche Fragmente beobachtete auch I. Türbachova bei der Synthese von MSP1F in rekombinanten *Toxoplasma gondii*, das mit *T. gondii* spezifischen Sekretions- und GPI-Signalen versehen war (I. Türbachova, 2000). Das von ihr nachgewiesene Fragment von ca. 27 kDa wurde ebenfalls durch mAk 5.2 erkannt und komigrierte mit rekombinantem MSP1F-19 aus *T. gondii*. Da das in meinem Fall erkannte Fragment bei der sekretierten Form von MSP1D-42 nicht auftrat, scheint der dafür verantwortliche Mechanismus entweder (i) mit dem Sekretionsprozess an sich zusammen zu hängen (bei der Auftrennung der zellulären Fraktion werden die sekretierten Proteine der rMVA-*msp1d/42S*-infizierten HeLa-Zellen nicht erfaßt), (ii) mit der Verankerung über den GPI oder (iii) mit Strukturen in oder auf der Plasmamembran-Außenseite. Die für das sekundäre Prozessierung verantwortliche Protease konnte bisher nicht isoliert werden (Blackman et al., 1993, Cooper and Bujard, 1992). Zwei Enzyme, denen eine Rolle bei der Invasion, und möglicherweise auch bei der Prozessierung von p42 zugesprochen wird, wurden isoliert (Blackman et al., 1998; Barale et al., 1999), der Nachweis für eine Beteiligung am zweiten Prozessierungsschritt konnte letztlich jedoch nicht geliefert werden. Versuche zur möglichen Prozessierung der rekombinanten Fragmente aus *T. gondii*, die Modifikation der potentiellen Schnittstelle, brachten keine Aufschluss ob es sich um die Fragmentierung durch eine Protease oder einen autokatalytischen Mechanismus handelt. Untersuchungen im Zusammenhang mit der Fragmentierung von MSP1 in MVA-infizierten Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

6.4 Rekombinante MVA als Impfstoff gegen Malaria

Immunologische Mechanismen, die zum Schutz vor Malaria führen sind sehr vielfältig und im Detail noch nicht verstanden. Sie unterscheiden sich zudem je nach Parasitenstadium. Der Schutz gegen die prä-erythrozytären Stadien wird vornehmlich CD8⁺-T-Zellen zugeschrieben, dabei ist es neben der zytotoxischen T-Zellantwort vor allem die Sekretion von Zytokinen wie Interferon- γ , die Schutz gegen die intra-hepatozytären Parasiten vermittelt. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass nicht nur Peptide der Leberstadien, sondern auch Epitope von Merozoiten-Proteinen über MHC Klasse I Komplexe präsentiert und durch zytotoxische T-Zellen erkannt werden. Im Schutz gegen die Blutstadien übernehmen Antikörpern eine tragenden Rolle, CD4⁺-T-Zellen und γ/δ -T-Zellen sind ebenfalls beteiligt (Plebanski and Hill, 2000; Berzins and Perlmann 1996). Hier gilt MSP1 als ein führender Malaria-Impfstoff-Kandidat. Auf der Oberfläche der Merozoiten ist es gleichzeitig das Ziel sowohl für neutralisierende als auch lytische Antikörper. Erstmals synthetisiert wird es während der Entwicklung der Parasiten in Hepatozyten, und hier werden Epitope des Proteins auf MHC Klasse I Komplexen präsentiert. Das macht die Induktion sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunreaktion durch einen MSP1-Impfstoff sinnvoll.

Die Entwicklung der Immunantwort wird in erster Linie durch die Wahl bestimmt, aber auch die Applikationsform beeinflusst die Art der Immunantwort: Impfungen mit gereinigten Proteinen unterscheiden sich von DNA-Immunisierungen oder der Infektion mit lebenden Impfstoffen, wie attenuierten Viren oder Bakterien. Kombinationen dieser Impfstoffe können das Immunsystem wiederum in neue Richtungen lenken.

Deutlich werden diese Unterschiede bei Versuchen mit verschiedensten Immunisierungsstrategien, wie sie bei experimentellen Malaria-Impfstoff auf Basis des Sporozoiten Oberflächen-Proteins CSP durchgeführt wurden. Dabei wurden rekombinante *Vaccinia*-Viren allein und in Kombinationen mit DNA-Injektionen (Degano et al., 1999), aufgereinigten Proteinpräparationen (Allsopp et al., 1996) oder rekombinanten Lebendimpfstoffen wie andere Viren (Rodrigues et al., 1994, Bruna-Romero et al., 2001) oder *Toxoplasma gondii* (Charest et al., 2000) untersucht. All diese Versuche zeigen, dass eine Kombination aus verschiedenen Strategien, bei denen rekombinante *Vaccinia*-Viren als Wiederholungs-Immunisierung eingesetzt wurden, sowohl den zellulären als auch den humoralen Zweig des Immunsystems am stärksten stimulierten und das höchste Maß an Schutz vermittelten. Applikationen von rekombinanten Viren allein oder zur Erstimmunisierung hingegen erwiesen sich als weniger immunogen und schützten die Versuchstiere selten vor Malaria. Vergleiche rekombinanter *Vaccinia*-Virus-Stämme untereinander belegen auch hier, dass rekombinante MVA verglichen zu anderen attenuierten Stämmen und auch zu replikationskompetenten *Vaccinia* Viren des Western Reserve Stamms das Immunsystem am effizientesten stimulieren (Schneider et al., 1998; Gilbert et al., 1999).

Schutz gegen Malaria durch Immunität gegen die Leberstadien unterscheidet sich von einer wirkungsvollen Immunantwort gegen Blutstadien, wie wir sie mit MSP1 als Antigen zu erreichen suchen. Es gibt nur wenige Arbeiten, die sich im Zusammenhang mit der Immunisierung gegen die Blutstadien rekombinanter Viren bedienen. So wurden Teile der

msp1-Sequenz aus *P. falciparum* allein oder als Teil einer Fusion aus Sequenzen mehrerer Malaria-Antigene in das Genom des Western Reserve Stamms integriert (Sandhu and Kennedy, 1994; Yang et al., 1997; Dong et al., 2001). Die Infektion von Mäusen und Kaninchen induzierte Antikörper gegen rekombinant hergestellte MSP1-Fragmente. Nachfolgende Veröffentlichungen, die sich mit dem Einsatz dieser Viren als Impfstoff befassen, gibt es nicht.

Bisher liegen nur zwei Studien vor, welche die schützenden Wirkung einer Immunisierung mit rekombinanten *Vaccinia* Viren auf Stufe der Merozoiten untersuchten: In beiden Studien beschreiben die Autoren, neben anderen Malaria-Antigenen die Gesamtsequenz des nativen *msp1* aus *P. falciparum* in das Genom der Viren integriert zu haben, können aber weder die Synthese des Proteins schlüssig belegen, noch die Produktion von MSP1-spezifischen Antikörpern in Affen und Menschen induzieren. In beiden Fällen bleibt die Immunisierung ohne Schutz gegen eine nachfolgenden Infektion mit Sporozoiten bzw. Merozoiten (Pye et al., 1991; Ockenhouse et al., 1998)

Letztlich gibt es keine Daten zur Kombination von *msp1*-rekombinanten *Vaccinia*-Viren mit alternativen Impfstrategien. Die Daten aus Versuchen zu CSP legen nahe, dass eine heterologe Strategie in der ein rekombinantes *Vaccinia*-Virus als Wiederholungs-Immunisierung eingesetzt wird, sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort stärker anregt, als die Immunisierung mit dem rekombinanten Virus allein. Da wir glauben, dass sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort gegen MSP1 wichtig ist im Schutz gegen Malaria, führte ich Versuche, ähnlich denen wie sie hier für CSP dargestellt wurden, auf Basis von MSP1 durch.

6.4.1 Die Induktion einer MSP1D-42-spezifischen Immunantwort durch *msp1d-42*-rekombinante MVA und MSP1D-HX42 aus *E. coli*

Die durchgeführten Immunisierungsversuche lassen sich in drei Gruppen aufteilen. Die Impfschemata sind in Tabelle 6.1 zusammenfassend aufgeführt.

Gruppe 1

	A		B	
Woche 0	rMVA- <i>msp1d/42S</i>	rMVA- <i>msp1d/42A</i>	rMVA- <i>msp1d/42S</i>	rMVA- <i>msp1d/42A</i>
Woche 3	rMVA- <i>msp1d/42S</i>	rMVA- <i>msp1d/42A</i>	rMVA- <i>msp1d/42A</i>	rMVA- <i>msp1d/42S</i>
Woche 6	rMVA- <i>msp1d/42S</i>	rMVA- <i>msp1d/42A</i>	rMVA- <i>msp1d/42A</i>	rMVA- <i>msp1d/42S</i>
Woche 10	MSP1D-HX42	MSP1D-HX42		

Gruppe 2

Woche 0	MSP1D-HX42
Woche 3	MSP1D-HX42
Woche 6	MSP1D-HX42

Gruppe 3	A		B	
Woche 0	rMVA-msp1d/42S	rMVA-msp1d/42A	MSP1D-HX42	MSP1D-HX42
Woche 3	MSP1D-HX42	MSP1D-HX42	rMVA-msp1d/42S	rMVA-msp1d/42A
Woche 6	MSP1D-HX42	MSP1D-HX42	rMVA-msp1d/42S	rMVA-msp1d/42A

Tabelle 6.1: Immunisierungsstrategien basierend auf rekombinanten MVA und MSP1D-HX42 aus *E. coli*

In Gruppe 1 wurden BALB/c Mäuse mit rekombinanten MVA immunisiert, entweder mit jeweils einem Virus-Typ, (rMVA-msp1d/42A oder rMVA-msp1d/42S) (diese Gruppe erhielt zusätzlich eine Immunisierung mit MSP1D-HX42 aus *E. coli*) (A), oder sie wurden mit einem Typ erstimmunisiert und die Immunisierung mit dem jeweils anderen wiederholt (B).

Den Mäuse der zweiten Gruppe wurde aus *E. coli* aufgereinigtes MSP1D-HX42 in Freund'schem Adjuvans injiziert, während die Mäuse der Gruppe 3 mit Kombinationen aus rekombinanten MVA und gereinigtem MSP1D-HX42 immunisiert wurden.

Immunisierung mit rekombinanten MVA

In der ersten Versuchsreihe wurden Mäuse dreimal mit jeweils einem Virustyp immunisiert. Die Antikörpertiter gegen p42 blieben insgesamt auch nach drei Immunisierungen niedrig. Die Titer der Mäuse, die mit rMVA-msp1d/42S infiziert wurden, stiegen dabei langsamer und blieben generell hinter denen der mit rMVA-msp1d/42A immunisierten Tiere zurück. Eine zusätzliche Stimulierung mit Protein (je 5 µg MSP1D-HX42) vier Wochen nach der letzten Virus-Injektion, verstärkte nur bei der mit rMVA-msp1d/42S immunisierten Gruppe die Antikörperentwicklung, so dass am Ende des Experiments beide Gruppen ähnliche Titer zeigten.

Bei Immunisierung der Mäuse mit verschiedenen Virustypen (Gruppe 1 B) unterschieden sich die beiden Gruppen im Mittel nicht. Aber die Antikörpertiter, die in beiden Fällen gemessen wurden, lagen zwei- bis dreimal höher als die der mit rMVA-msp1d/42A allein immunisierten Tiere.

Immunisierung mit MSP1D-HX42 aus *E. coli*

Eine weitere Gruppe von Mäusen wurde dreimal mit jeweils 5 µg MSP1D-HX42 aus *E. coli* immunisiert. Im Gegensatz zu den Versuchen mit MVA als Erstimmunisierung wurden bei dieser Gruppe bereits nach der ersten Injektion MSP1D-42-spezifische Antikörper im Serum gemessen. Diese Titer stiegen durch die beiden Wiederholungsimmunisierungen sehr stark an und blieben auch sieben Wochen nach der letzten Immunisierung auf einem sehr hohen Wert. Die großen Unterschiede in den Titern der einzelnen Tiere sind auf die Entmischung der Emulsionen während der Erstimmunisierung zurückzuführen und macht die Wiederholung dieses Versuchs notwendig um letztlich verlässliche Aussagen treffen zu können.

Immunisierung mit Kombinationen aus rekombinanten MVA und MSP1D-HX42 aus *E. coli*

Die humorale Immunantwort, wie sie durch die rMVA-Erstimmunisierung induziert wurde, konnte durch die heterologe Immunisierung mit Protein verstärkt werden, bleibt aber unter Titern, wie sie bei der Immunisierung mit p42 allein erreicht werden. Im Mittel ähneln die Titer denen bei Immunisierungen mit rekombinanten MVA allein (Gruppe 1 A).

Ein anderes Bild stellte sich dar, wurde das Immunsystem erst mit Protein induziert. Bei der ersten Immunisierungswiederholung mit rMVA-msp1d/42A wurden die höchsten

Antikörpertiter aller Immunisierungsansätze gemessen, lediglich die rein mit MSP1D-HX42 immunisierten Mäuse zeigten ähnlich hohe Titer und dies erst nach drei Immunisierungen. Trotz einer zweiten Wiederholung mit rMVA-msp1d/42S bzw. rMVA-msp1d/42A sanken die MSP1D-42-spezifischen Antikörpertiter jedoch schon drei Wochen nach der letzten Impfung sehr stark.

Jeder der Immunisierungsversuche wurde mit fünf Mäusen durchgeführt. Bei großen Schwankungen in den gemessenen Titern, wie sie besonders in Gruppe 2 gemessen wurden, lassen sich daher kaum quantitativ signifikanten Aussagen treffen. In diesem beschränkten Rahmen werden lediglich die folgenden Tendenzen deutlich, welche die Konzeption späterer Immunisierungsversuche beeinflussen können:

- (i) Die durch rekombinante MVA allein induzierten, p42-spezifischen Antikörpertiter waren niedrig verglichen zu Titern, wie sie durch die Immunisierung mit gereinigtem MSP1D-HX42 in Freund'schem Adjuvans gemessen wurden.
- (ii) In Bezug auf die p42-spezifische Immunantwort erschien rMVA-msp1d/42A immunogener als rMVA-msp1d/42S.
- (iii) Heterologe Immunisierungsstrategien induzierten eine stärkere humorale Immunantwort, wird MVA als Wiederholungs-Immunisierung eingesetzt. Dies traf auf die Kombination der beiden rMVA-Typen miteinander zu, wurde aber am deutlichsten in der Kombination eines rMVA-Typs mit dem Protein als Erstimmunogen. Dagegen zeigte die Kombination aus rMVA-Erstimmunisierung und Wiederholung mit MSP1D-HX42 aus *E. coli* kein höheres Immunisierungspotential als die Infektion mit rekombinanten MVA allein.
- (iv) Im Vergleich zu Immunisierungen, die rekombinante MVA mit einbeziehen, erschien die humorale Antwort bei Immunisierung mit MSP1D-HX42 aus *E. coli* emulgiert in Freund'schem Adjuvans langlebiger.

Diese Punkte werden im Folgenden näher erläutert:

Durch die Immunisierung mit rekombinanten MVA wird neben der Reaktion gegen das heterologe Protein auch eine Immunreaktion gegen das Virus induziert, wie an den hohen Titern MVA-neutralisierender Antikörper zu erkennen. Dies führt bei den nachfolgenden Immunisierungen mit MVA zur raschen Neutralisation der injizierten Viren, damit zu einer reduzierten, MVA-vermittelten Synthese von p42 und zu einer geringeren Stimulation des Immunsystems. Außerdem wird das Immunsystem durch die Virusinfektionen in Richtung einer T_H1 vermittelten Antwort gelenkt, was über die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- β und INF- γ zur Inhibition von antikörperproduzierenden B-Lymphozyten führt.

Die Induktion einer T_H1 -basierenden Immunantwort und die damit unterdrückte Produktion von Antikörper wird auch der Grund für den ausbleibenden Effekt der Proteinimmunisierung nach der Infektion mit rekombinanten MVA sein (Gruppe 3 A).

Immunisierungen mit Proteinpräparationen führen verglichen zu Virusinfektionen eher zu einer T_H2 -vermittelte Immunantwort, was sich in den hohen Antikörpertiter der mit Protein immunisierten Mäuse widerspiegelt. Dass die Antikörpertiter allerdings erst nach der dritten Immunisierung sehr stark anstiegen, d.h. neun Wochen nach der ersten Immunisierung, mag daran liegen, dass die Bindung des Antigen durch bereits gebildete Antikörper die Aufnahme

durch antigenpräsentierende Zellen verstärkt, was letztlich die Aktivierung von B-Zellen fördert. Dieser Effekt scheint erst nach der dritten Immunsierung zum Tragen zu kommen.

Die unterschiedliche Immunogenität löslicher und verankerter Proteine wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Yang et al., 1997; Langford et al., 1986). Unter Umständen verändert die Oberflächenverankerung die Struktur von MSP1 und verstärkt dadurch dessen Immunogenität. Eine alternative Struktur könnte ebenfalls die unterschiedliche Erkennung der sekretierten und verankerten MSP1D-Fragmente durch die monoklonalen Antikörper 12.8 und 12.10 erklären. Im Weiteren erscheint das Protein auf der Oberfläche in höherer, lokaler Konzentration, außerdem können gelöste und oberflächenverankerte Proteine von unterschiedlichen antigenpräsentierenden Zellen (z.B. B-Lymphozyten und Makrophagen) prozessiert und präsentiert werden, was sich ebenso in Unterschieden bezüglich der Immunreaktion auswirken kann. Auch der GPI-Anker selbst kann die Immunantwort verstärken: Es ist bekannt, dass der authentische *P. falciparum* GPI-Anker das Immunsystem stimuliert, indem er die Sekretion von TNF α und IL-1 durch Makrophagen aktiviert (Tachado et al., 1997). In unserem Fall handelt es sich um die humane DAF-GPI-Signalsequenz, die im Endoplasmatischen Retikulum der Maus gegen einen endogenen GPI-Anker ausgetauscht wird. Daher entfällt diese Art der Immunstimulation.

Die Kombination der Virustypen verstärkt die humorale Immunantwort. Möglicherweise wird das unterschiedlich präsentierte Antigen durch verschiedene, antigen-präsentierende Zellen aufgenommen, was die Antwort stärker stimuliert.

Ähnlich hohe Antikörpertiter gegen p42 wie die durch die Immunisierung mit gereinigtem Protein induziert wurden, zeigten im Weiteren nur die Tiere der Gruppe 3 B. Im Unterschied dazu blieben die Titer, wie sie bei den Tieren der Gruppe 3 A gemessen wurden, hinter diesen weit zurück. Gründe, warum die Reihenfolge der Immunsierungen einen derart gravierenden Unterschied in der Immunreaktion der Versuchstiere hervorrief, liegen in den unterschiedlichen Funktionen, welche mit den jeweiligen Zeitpunkten einhergehen: (i) Durch die Erstimmunisierung mit MSP1D-HX42 wird das Immunsystem auf dem Kontakt mit diesem Antigen „vorbereitet“. Die Erstimmunisierung ist als ein Punkt zu werten, an dem die Spezifität der humoralen Immunreaktion festgelegt wird, d.h. in diesem Fall die Reaktion gegen MSP1D-42. Wird das Immunsystem in einem zweiten Schritt durch die Virusinfektion angeregt und kommt gleichzeitig in wiederholten Kontakt zum Erstantigen, so wird die schon induzierte, spezifische Immunantwort vorrangig stimuliert (Klenerman and Zinkernagel, 1998), und das stärker als durch das Protein allein. Infiziert man die Mäuse zuerst mit rekombinanten Viren, so ist die Immunantwort ausgeprägter, richtet sich aber nicht nur gegen das heterologe Antigen, sondern vornehmlich gegen viruseigene, immunodominante Antigene. In diesem Fall ist die Reaktion auf MSP1D-42 eine Antwort neben der virusspezifischen, das heißt die Spezifität der Reaktion ist breiter gefächert, als durch den Erstkontakt zum Protein. (ii) Eine Immunisierung durch gereinigtes Protein lenkt das Immunsystem in die Richtung einer T_H2 vermittelten Antwort, die im zweiten Schritt durch die Virusinfektion verstärkt wird. Dagegen etabliert die Erstinfektion mit einem Virus

vornehmlich eine T_H1 vermittelte Immunantwort. Aber auch der durch MVA exprimierte IL-1 β -Rezeptor und damit das „Neutralisieren“ des Zytokins mag für das geringe „Priming“-Potential von MVA verantwortlich sein (Schneider et al., 1998). Interessanterweise unterschied sich die Reaktion auf die Wiederholungs-Immunsierung mit Protein von der Reaktion aus den ersten Experimenten (Gruppe 1 A). Dort reagierten die mit rMVA-*msp1d/42A* immunisierten Mäuse nicht mit steigenden Antikörpertitern auf die zusätzlichen Protein-Injektion. Es scheint als könnte diese Proteininjektion nach der Immunsierung mit MVA das Immunsystem nicht über einen relativ niedrigen Antikörpertiter hinaus anregen, was ebenfalls mit der Polarisierung des Immunsystems in Richtung T_H1 erklärt werden kann. Dass die p42-spezifischen Antikörpertiter der Gruppe 3 B trotz der zweiten rMVA-Infektion sinken, ist auf die schon erwähnte Neutralisation der Viren zurückzuführen. Eine zweite Erklärung geht noch weiter: Die Mäuse wurden mit sehr hohen Virus-Titern intraperitoneal (i.p.) immunisiert. Das bedeutet, dass die Viren nicht nur lokal Zellen infizierten, sondern wahrscheinlich systemisch auftraten, das heißt auch in der Leber, was zur Induktion von Toleranz gegen das Antigen führen kann (Limmer et al., 2000). Das würde auf alle hier durchgeführten Immunsierungsversuche mit MVA zutreffen. Zwei Versuche sprechen jedoch gegen diese Theorie: (i) Untersuchungen mit unterschiedlichen Virustitern schützten bei der Immunsierung mit *P. yoelii* CSP-DNA und rekombinanten NYVAC mit steigenden Virustitern eine größere Zahl von Mäusen vor Malaria (Sedegah et al., 2000). (ii) In Versuchen im Zusammenhang mit der Expression oberflächenverankerten S-Antigens aus *P. falciparum* in rekombinanten Vaccinia Viren wurden die Unterschiede bezüglich der Antikörpertiter gegen das heterologe Antigen und gegen das Trägervirus untersucht (Langford et al., 1986). Dabei zeigte sich, dass die Titer gegen das S-Antigen nach der zweiten Immunsierung abfielen, während die Titer gegen die Viren weiter stiegen. Dies ist ein Hinweis, dass in diesem Fall die Neutralisation der Viren verantwortlich war für das Fallen der Titer gegen das Malaria-Antigen. Im Fall einer Toleranzentwicklung würden die Titer der MVA-spezifischen Antikörper ebenfalls sinken.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Gruppe 3 B sind Experimente sinnvoll, bei denen an Stelle der zweiten Auffrischung mit rekombinanten Viren eine Immunsierung mit Protein treten würde, d.h. Protein-Erstimmunsierung, erste Wiederholung durch rekombinante MVA und eine weitere Immunsierung mit gereinigtem Protein. Möglicherweise wäre diese Stimulation effektiver, als die, wegen der Virus-Elimination schwach ausfallende Expression von MSP1D-42 durch virusinfizierte Zellen.

6.4.2 Ausblicke zur Entwicklung eines Impfstoffs gegen Malaria auf Basis von MSP1 und MVA

Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, einen Impfstoff auf Basis des gesamten MSP1 zu entwickeln. Mittlerweile ist es uns gelungen, auch die synthetische Gesamtsequenz des *msp1f* in MVA zu integrieren. Die Versuche mit Viren, die das Gesamt-*msp1* entweder als ein Gen oder in Form von zwei Teilen integriert in die Deletion III bzw. VI enthalten, werden

außerdem zeigen, in welchem Maß die Menge an synthetisiertem Protein die Immunantwort beeinflusst. Der Beitrag meiner Arbeit liegt darin, die Möglichkeiten zum Einsatz von rekombinanten MVA als Träger von MSP1 zu untersuchen, und die Immunisierungen an Mäusen sind der erste Schritt zur Analyse der durch rekombinanten MVA und Protein induzierten Immunantwort.

Auf Grund der niedrigen Zahl an Tieren, wie sie durch die Anzahl der verschiedenen Immunisierungsstrategien geboten war, können bisher nur vorläufige Interpretationen getroffen werden. Daher ist es sinnvoll, Versuche mit einer größeren Zahl an Tieren zu wiederholen, um quantitativ signifikante Aussagen treffen zu können, Diese Versuche sollten ebenfalls mit Viren wiederholt werden, welche die gesamte *msp1*-Sequenz tragen und in Kombination mit dem Gesamt-Protein durchgeführt werden. Gemessen an der humoralen Immunantwort gegen p42, die sich in den Antikörpertitern der hier dargestellten Immunisierungsversuche zeigt, erscheinen zwei Immunisierungsstrategien sinnvoll: (i) Immunisierung nur mit Protein, da der entsprechender Vorversuch mit p42 hohe und stabile Antikörpertiter lieferte; (ii) Immunisierung mit Protein, gefolgt von einer Stimulierung mit rMVA-*msp1/A* mit nachfolgender erneuter Stimulation mit Protein. Da man davon ausgehen kann, dass MVA eine zelluläre Immunantwort hervorruft, wird von uns zur Zeit der zweite Weg favorisiert. Irina Idler in unserem Labor wird sich in diesem Zusammenhang in Kollaboration mit Prof. Rammensee in Tübingen mit der Charakterisierung der zellulären Immunantwort und mit der Identifikation potentieller T-Zell-Epitope von MSP1 befassen.

Experimente an Mäusen sind interessant, um Einblicke bezüglich der Gesamtimmunogenität zu erhalten. Will man die Reaktion detaillierter betrachten, empfiehlt es sich, Versuche an Tieren durchzuführen, deren Immunsystem dem des Menschen ähnlicher ist. So sind in Zusammenarbeit mit dem Walter Reed Army Institute of Reseach (WRAIR) Immunisierungsexperimente an Resus-Affen geplant. Diese Versuche sollen auch Aufschluß über das beste Adjuvans geben, mit dem zusammen das Protein verabreicht werden soll.

Bei der Untersuchung der Affen- und später auch der Humanseren ist neben den Gesamt-Antikörpertitern auch die Analyse der Immunglobulinsubtypen wichtig. Es ist bekannt, dass die Immunglobuline gegen MSP1, wie sie bei klinisch-immunen Menschen in endemischen Gebieten gefunden wurden, vornehmlich dem IgG1- und IgG3-Subtyp angehören. Demnach gehören Antikörper gegen MSP1-19 vor allem dem IgG1-Subtyp an, während die Antikörperreaktion gegen den polymorphen Block 2 in erster Linie durch IgG3 vermittelt wird (Cavanagh et al., 2001; Jouin et al., 2001). Einer weiteren Studie zu Folge ist zusätzlich auch ein hoher IgG2- in Verbindung mit einem niedrigen IgG4-Titer mit klinischer Immunität gegen Malaria assoziiert (Aucan et al., 2000). Welcher der hier vorgeschlagenen Immunisierungsansätze letztlich der sinnvollste ist, hängt folglich auch von den induzierten Immunglobulin-Subtypen ab, was wiederum zusammenhängt mit der Präsentation des Antigens (Protein, DNA, rekombinante Viren) wie auch dem Adjuvans (Kumar et al., 2000).

Letztlich sind es aber nur Immunisierungen an Menschen selbst, die zeigen werden, ob eine Impfung vor der Infektion durch *P. falciparum* schützt.

Zur Immunisierung mit aus *E. coli* gereinigtem MSP1D-HX42 wurde in dieser Arbeit Freund'sches Adjuvans verwendet, ein sehr potentes Adjuvans, das eine starke Entzündung und dadurch eine ausgeprägte Immunreaktion auslöst. Auf Grund der sehr starken Nebenwirkungen ist es allerdings nicht für den Menschen zugelassen, was Tests von anderen Adjuvantien notwendig macht. Immunisierungen mit Aluminiumhydroxid, einem gängigen Adjuvans, konnten in *Aotus*-Affen nur niedrige Antikörpertiter und keinen Schutz vermitteln (Kumar et al., 2000). Andere Adjuvantien lösten zwar eine stärkere, humorale und zelluläre Immunsantwort aus, aber nur wenige vermittelten letztlich Schutz vor Malaria. Allein der CSP-Impfstoff RTS,S emulgiert mit SBAS2 schützte sechs von sieben Personen vor der Infektion mit *P. falciparum* (Stoute et al., 1997), und eine Fusion von MSP1-19 an T-Zell-Epitope von Tetanus-Toxin führte formuliert in dem Block Kopolymer P1005 in Versuchen an Affen zu niedrigeren Parasitämien (Yang et al., 1999). Für unser Vorhaben ist geplant, die von Smith Kline Glaxo entwickelten Adjuvantien einzusetzen, zu denen auch SBAS2 gehört. Welches der zur Verfügung stehenden Präparate schließlich zum Einsatz kommen wird, soll an Rhesus-Affen ermittelt werden.

MVA wurde während des Pocken-Ausrottungsprogramms zur Immunisierung eingesetzt. Daher ist das Virus als Impfstoff am Menschen zugelassen und gilt durch die Anwendung auch bei immunsupprimierten Personen als sehr sicher (Mayr and Danner, 1978). Einher damit geht aber auch ein hoher Prozentsatz an Menschen, die gegen MVA immun sind. Dies stellt jedoch nur bedingt ein Problem dar. Die Zielgruppe eines Impfstoffes sind Kleinkinder in endemischen Gebieten. Bei ihnen wird keine Immunität gegen MVA erwartet, da Pockenimpfungen vor etwa zwei Jahrzehnten eingestellt wurden. Es hat sich zudem herausgestellt, dass auch bei Personen, die vor langer Zeit geimpft wurden, die Infektion mit MVA zu einer erneuten, heftigen Immunreaktion führt (Dr. G. Sutter, persönliche Mitteilung).

MVA ist nicht der einzige Lebendimpfstoff, der zur Immunisierung von Menschen zugelassen ist und der als Träger für MSP1 dient. In Kollaboration mit Prof. Martin Billeter und Dr. Lee Martin, Universität Zürich, werden vier rekombinante, attenuierte Masern-Viren, welche die synthetischen DNA-Sequenzen für die sekretierte oder verankerte Form von MSP1D-42 und das Gesamt-MSP1D tragen, entwickelt. Einerseits können diese Viren allein auf ihre immunogenen Eigenschaften hin untersucht werden, aber analog den Versuchen, die wir mit Kombinationen aus rekombinanten MVA und MSP1D-HX42 durchführten, ist die Kombination von rekombinanten Masern-Viren und MVA ebenfalls möglich, ähnlich den schon erwähnten Versuchen mit *Adeno*- oder *Influenza*- kombiniert mit *Vaccinia*-Viren.

Dr. Miao Jun in unserem Labor verfolgt zudem den Ansatz der DNA-Immunisierung mit *msp1* Plasmid-Vektoren.

Die Verfügbarkeit von rekombinanten *Vaccinia* und Masernviren, die unterschiedlich modifizierte *msp1*-Sequenzen tragen, DNA-Vakzine, wie auch die Herstellung von MSP1-Protein nach GMP-Maßstäben ermöglicht es, eine Reihe von Immunisierungsstrategien zu verfolgen, die neue Erkenntnisse über die Induktion einer durch gentechnische hergestellte Impfstoffe hervorgerufene Immunantwort gegen Blutstadien von *P. falciparum* liefern werden.

Durch die Infektion mit *P. falciparum* sterben jedes Jahr zwischen 700.000 und 2,7 Millionen Menschen, 75% davon Kinder unter fünf Jahren. Kleinkinder sind somit die Hauptzielgruppe eines Impfstoffes, da sie am meisten vom Tod und auch von bleibenden Schäden, wie sie z.B. durch zerebrale Malaria hervorgerufen werden, bedroht sind. Dabei ist es nicht unbedingt notwendig, dass dieser Impfstoff eine sterile Immunität vermittelt. Die Induktion einer klinischen Immunität oder auch nur mildere Krankheitssymptome und der Schutz vor einer tödlichen Infektion wären ein großer Fortschritt. Der frühe Erwerb einer partiellen Immunität könnte diese Kriterien erfüllen und die natürliche Infektion könnte diese Immunität stimulieren, so dass die Kinder frühzeitig die erstrebte, klinische Immunität erreichen würden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Malaria, insbesondere die durch *P. falciparum* verursachte *Malaria tropica* ist nach wie vor eine der meist verbreiteten und gefährlichsten Infektionskrankheiten der Welt. Die Ausbreitung von Resistenzen sowohl der Erreger (*Plasmodium*) als auch des Vektors *Anopheles* macht die Suche nach neuen Wegen zur Bekämpfung der Krankheit notwendig. Eine entscheidende Rolle kommt in diesem Zusammenhang der Impfstoffentwicklung zu.

Das Hauptoberflächenprotein 1 des Merozoiten-Stadiums der *Plasmodium ssp.* (MSP1) gilt als ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung eines Multikomponenten-Impfstoffs gegen Malaria. Belegt wird dies durch epidemiologischen Studien und durch zahlreichen Versuchen, in denen Immunisierungen mit nativem MSP1 oder rekombinant hergestellten, C-terminalen Fragmenten des Proteins Schutz gegen die Krankheit in verschiedenen Tiermodellen vermittelte.

Die Struktur von MSP1 wird aufgrund der Existenz von zwei unterschiedlichen Genvarianten, die nach zwei repräsentativen Isolaten K1 und MAD20 benannt wurden, als dimorph bezeichnet. In Anbetracht des Einsatzes als Impfstoff ist es daher notwendig, beide Prototypen in ausreichenden Mengen reproduzierbar und in hoher Qualität herzustellen.

Durch die chemische Synthese des *mssl*-Gens (*mssl* des K1-Prototyps) aus *Plasmodium falciparum* in unserem Labor ist es erstmals gelungen, das Gen in seiner gesamten Länge in prokaryotischen und eukaryotischen Systemen zu klonieren und das Protein heterolog herzustellen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese des *mssl*-Gens (*mssl* des MAD20-Prototyp) abgeschlossen und das Gen anschließend in *E. coli* kloniert und exprimiert.

Während der *P. falciparum*-Infektion wird *mssl* erstmals bei der Entwicklung der Merozoiten in der Leber exprimiert, was die infizierten Hepatozyten zum potentiellen Ziel einer zellulären Immunantwort macht. Dieser Zweig des Immunsystems wird effektiv durch virale Infektionen stimuliert. Auf Grund dessen befaßt sich der Hauptteil der vorliegenden Arbeit mit der Entwicklung eines experimentellen Impfstoffs auf Basis rekombinanter, *mssl*-exprimierender *Vaccinia*-Viren. Sowohl die Gesamtsequenz als auch zwei für C-terminale MSP1-Fragmente kodierende Sequenzen des synthetischen *mssl*-Gens wurden in das Genom des hochattenuierten *Vaccinia* Virus MVA (Modifiziertes *Vaccinia*-Virus Ankara) integriert und exprimiert. Durch die Fusion an die Signalsequenz des Decay Accelerating Factor (DAF) wurden die Proteine in das Medium exportiert, die zusätzliche Fusion an die GPI-Ankersequenz aus DAF bewirkte die Oberflächenverankerung der Proteine auf infizierten Zellen. Erste Untersuchungen zur Immunogenität der rekombinanten MVA im Mausmodell wurden mit zwei Viren durchgeführt, die für das C-terminale, 42kDa große MSP1-Fragment (MSP1-42), entweder in sekretierter oder oberflächenverankerter Form, kodieren. Unterschiedliche Kombinationen der rekombinanten Viren untereinander und mit gereinigtem MSP1D-42 aus *E. coli* lieferten folgende Ergebnisse: (i) Durch rekombinante MVA induzierte, MSP1D-42-spezifische Antikörpertiter waren niedrig verglichen zur Immunisierung mit MSP1D-42 aus *E. coli*. (ii) Bezüglich der humoralen Immunantwort erschien verankertes MSP1D-42 immunogener als sekretiertes. (iii) Eine starke, wenn auch sehr kurzlebige, humorale Immunantwort wurde durch die Immunisierung mit einer Kombination aus Proteinerstimulierung und nachfolgender Stimulation durch rekombinante MVA induziert. Einzig die Immunisierung mit MSP1D-42 aus *E. coli* allein lieferte langanhaltend hohe Antikörpertiter. Diese Versuche geben erste Aufschlüsse über die Induktion der humoralen Immunantwort durch Kombinationen unterschiedlicher Antigen-Applikationsformen und liefern Entscheidungshilfen beim Entwurf weiterer Immunisierungsprotokolle.

8. LITERATUR

AIDS Vaccine Evaluation Group (2001). Cellular and humoral immune responses to a canarypox vaccine containing human immunodeficiency virus type 1 Env, Gag, and Pro in combination with rgp120. *J Infect Dis* 183, 563-70.

Allsopp, C. E., Plebanski, M., Gilbert, S., Sinden, R. E., Harris, S., Frankel, G., Dougan, G., Hioe, C., Nixon, D., Paoletti, E., Layton, G., and Hill, A. V. (1996). Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization. *Eur J Immunol* 26, 1951-9.

Amara, R. R., Villinger, F., Altman, J. D., Lydy, S. L., O'Neil, S. P., Staprans, S. I., Montefiori, D. C., Xu, Y., Herndon, J. G., Wyatt, L. S., Candido, M. A., Kozyr, N. L., Earl, P. L., Smith, J. M., Ma, H. L., Grimm, B. D., Hulsey, M. L., Miller, J., McClure, H. M., McNicholl, J. M., Moss, B., and Robinson, H. L. (2001). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292, 69-74.

Aucan, C., Traore, Y., Tall, F., Nacro, B., Traore-Leroux, T., Fumoux, F., and Rihet, P. (2000). High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 68, 1252-8.

Ballou, W. R., Hoffman, S. R., Sherwood, J. A., Hollingdale, M. R., Neva, F. H., Hockmeyer, W. T., Gordon, D. M., Wirtz, R. A., Schneider, I., Wasserman, G. F., Young, J. F., Diggs, C. L., Reeve, P., and Chulay, J. D. (1987). Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet* 1, 1277-1281.

Barale, J. C., Blisnick, T., Fujioka, H., Alzari, P. M., Aikawa, M., Braun-Breton, C., and Langsley, G. (1999). *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6445-50.

Barouch, D. H., Santra, S., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Plishka, R., Buckler-White, A., Gaitan, A. E., Zin, R., Nam, J. H., Wyatt, L. S., Lifton, M. A., Nickerson, C. E., Moss, B., Montefiori, D. C., Hirsch, V. M., and Letvin, N. L. (2001). Reduction of simian-human immunodeficiency virus 89.6P viremia in rhesus monkeys by recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccination. *J Virol* 75, 5151-8.

Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., Taraschi, T. F., and Howard, R. J. (1995). Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82, 77-87.

Berendt, A. R., Simmons, D. L., Tansey, J., Newbold, C. I., and Marsh, K. (1989). Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 341, 57-9.

Berzins, K., Perlmann, H., Wahlin, B., Ekre, H. P., Hogh, B., Petersen, E., Wellde, B., Schoenbechler, M., Williams, J., Chulay, J., and et al. (1991). Passive immunization of Aotus monkeys with human antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA. *Infect Immun* 59, 1500-6.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.

Blackman, M. J., Chappel, J. A., Shai, S., and Holder, A. A. (1993). A conserved parasite serine protease processes the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol* 62, 103-14.

Blackman, M. J., Fujioka, H., Stafford, W. H., Sajid, M., Clough, B., Fleck, S. L., Aikawa, M., Grainger, M., and Hackett, F. (1998). A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J Biol Chem* 273, 23398-409.

Blackman, M. J., Heidrich, H. G., Donachie, S., McBride, J. S., and Holder, A. A. (1990). A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J. Exp. Med.* 172, 379-382.

Blackman, M. J., Scott, F. T., Shai, S., and Holder, A. A. (1994). Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J Exp Med* 180, 389-93.

Blackman, M. J., Whittle, H., and Holder, A. A. (1991). Processing of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 35-44.

Blanchard, T. J., Alcamì, A., Andrea, P., and Smith, G. L. (1998). Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol* 79, 1159-67.

Borre, M. B., Dziegiel, M., Hogh, B., Petersen, E., Rieneck, K., Riley, E., Meis, J. F., Aikawa, M., Nakamura, K., Harada, M., and et al. (1991). Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 49, 119-31.

Borysiewicz, L. K., Fiander, A., Nimako, M., Man, S., Wilkinson, G. W., Westmoreland, D., Evans, A. S., Adams, M., Stacey, S. N., Bournsnel, M. E., Rutherford, E., Hickling, J. K., and Inglis, S. C. (1996). A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* *347*, 1523-7.

Boyle, J. S., and Lew, A. M. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* *11*, 8.

Bruna-Romero, O., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Hafalla, J. C., Tsuji, M., and Nussenzweig, R. S. (2001). Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 11491-6.

Burghaus, P. A., Gerold, P., Pan, W., Schwarz, R. T., Lingelbach, K., and Bujard, H. (1999). Analysis of recombinant merozoite surface protein-1 of *Plasmodium falciparum* expressed in mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol* *104*, 171-83.

Burghaus, P. A., Wellde, B. T., Hall, T., Richards, R. L., Egan, A. F., Riley, E. M., Ballou, W. R., and Holder, A. A. (1996). Immunization of *Aotus nancymai* with recombinant C terminus of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in liposomes and alum adjuvant does not induce protection against a challenge infection. *Infect Immun* *64*, 3614-9.

Carlson, J., Nash, G. B., Gabutti, V., al-Yaman, F., and Wahlgren, M. (1994). Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. *Blood* *84*, 3909-14.

Cavanagh, D. R., Dobano, C., Elhassan, I. M., Marsh, K., Elhassan, A., Hviid, L., Khalil, E. A., Theander, T. G., Arnot, D. E., and McBride, J. S. (2001). Differential patterns of human immunoglobulin G subclass responses to distinct regions of a single protein, the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* *69*, 1207-11.

Certa, U., Rotmann, D., Matile, H., and Reber-Liske, R. (1987). A naturally occurring gene encoding the major surface antigen precursor p190 of *Plasmodium falciparum* lacks tripeptide repeats. *EMBO J.* *6*, 4137-4142.

Chandramohan, D., and Greenwood, B. M. (1998). Is there an interaction between human immunodeficiency virus and *Plasmodium falciparum*? *Int J Epidemiol* *27*, 296-301.

Chang, S. P., Case, S. E., Gosnell, W. L., Hashimoto, A., Kramer, K. J., Tam, L. Q., Hashiro, C. Q., Nikaido, C. M., Gibson, H. L., Lee-Ng, C. T., Barr, P. J., Yokota, B. T., and Hut, G. S. (1996). A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects *Aotus* monkeys against malaria. *Infect Immun* *64*, 253-61.

- Chang, S. P., Kramer, K. J., Yamaga, K. M., Kato, A., Case, S. E., and Siddiqui, W. A. (1988). *Plasmodium falciparum*: gene structure and hydropathy profile of the major merozoite surface antigen (gp190) of the Uganda-Palo Alto isolate. *Exp. Parasitol.* 67, 1-11.
- Charest, H., Sedegah, M., Yap, G. S., Gazzinelli, R. T., Caspar, P., Hoffman, S. L., and Sher, A. (2000). Recombinant attenuated *Toxoplasma gondii* expressing the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein provides highly effective priming for CD8+ T cell-dependent protective immunity against malaria. *J Immunol* 165, 2084-92.
- Chen, H., and Kendall, D. A. (1995). Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J Biol Chem* 270, 14115-22.
- Chitarra, V., Holm, I., Bentley, G. A., Petres, S., and Longacre, S. (1999). The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Mol Cell* 3, 457-64.
- Clark, I. A., Rockett, K. A., and Cowden, W. B. (1991). Role of TNF in cerebral malaria. *Lancet* 337, 302-3.
- Clements-Mann, M. L., Weinhold, K., Matthews, T. J., Graham, B. S., Gorse, G. J., Keefer, M. C., McElrath, M. J., Hsieh, R. H., Mestecky, J., Zolla-Pazner, S., Mascola, J., Schwartz, D., Siliciano, R., Corey, L., Wright, P. F., Belshe, R., Dolin, R., Jackson, S., Xu, S., Fast, P., Walker, M. C., Stablein, D., Excler, J. L., Tartaglia, J., Paoletti, E., and et al. (1998). Immune responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 induced by canarypox expressing HIV-1MN gp120, HIV-1SF2 recombinant gp120, or both vaccines in seronegative adults. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis* 177, 1230-46.
- Clyde, D. F., McCarthy, V. C., Miller, R. M., and Woodward, W. E. (1975). Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 397-401.
- Clyde, D. F., Most, H., McCarthy, V. C., and Vanderberg, J. P. (1973). Immunization of man against sporozoite-induced *falciparum* malaria. *Am. J. Med. Sci.* 266, 169-177.
- Cohen, S., McGregor, I. A., and Carrington, S. C. (1961). Gamma globulin and acquired immunity to malaria. *Nature.* 192, 733-737.
- Collins, W. E., Pye, D., Crewther, P. E., Vandenberg, K. L., Galland, G. G., Sulzer, A. J., Kemp, D. J., Edwards, S. J., Coppel, R. L., Sullivan, J. S., and et al. (1994). Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. *Am J Trop Med Hyg* 51, 711-9.

Conway, D. J., Cavanagh, D. R., Tanabe, K., Roper, C., Mikes, Z. S., Sakihama, N., Bojang, K. A., Oduola, A. M., Kremsner, P. G., Arnot, D. E., Greenwood, B. M., and McBride, J. S. (2000). A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med* 6, 689-92.

Cooper, J. A. (1993). Merozoite Surface Antigen-1 of *Plasmodium*. *Parasitol. Today* 9, 50-54.

Cooper, J. A., and Bujard, H. (1992). Membrane-associated proteases process *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-1 (MSA1) to fragment gp41. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 151-160.

Cooper, J. A., Cooper, L. T., and Saul, A. J. (1992). Mapping of the region predominantly recognized by antibodies to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 301-312.

Craig, A., and Scherf, A. (2001). Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol* 115, 129-43.

Crewther, P. E., Matthew, M. L., Flegg, R. H., and Anders, R. F. (1996). Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect Immun* 64, 3310-7.

Daly, T. M., and Long, C. A. (1993). A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect. Immun.* 61, 2462-7.

Daubersies, P., Thomas, A. W., Millet, P., Brahimi, K., Langermans, J. A., Ollomo, B., BenMohamed, L., Slierendregt, B., Eling, W., Van Belkum, A., Dubreuil, G., Meis, J. F., Guerin-Marchand, C., Cayphas, S., Cohen, J., Gras-Masse, H., Druilhe, P., and Mohamed, L. B. (2000). Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3. *Nat Med* 6, 1258-63.

Deans, J. A., Knight, A. M., Jean, W. C., Waters, A. P., Cohen, S., and Mitchell, G. H. (1988). Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol* 10, 535-52.

Degano, P., Schneider, J., Hannan, C. M., Gilbert, S. C., and Hill, A. V. (1999). Gene gun intradermal DNA immunization followed by boosting with modified vaccinia virus Ankara: enhanced CD8+ T cell immunogenicity and protective efficacy in the influenza and malaria models. *Vaccine* 18, 623-32.

del Portillo, H. A., Gysin, J., Mattei, D. M., Khouri, E., Udagama, P. V., Mendis, K. N., and David, P. H. (1989). *Plasmodium vivax*: cloning and expression of a major blood-stage surface antigen. *Exp. Parasitol.* 67, 346-353.

Deleersnijder, W., Hendrix, D., Bendahman, N., Hanegreefs, J., Brijs, L., Hamers, C. C., and Hamers, R. (1990). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the major merozoite surface antigen of *Plasmodium chabaudi chabaudi* IP-PC1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43, 231-244.

Delplace, P., Fortier, B., Tronchin, G., Dubremetz, J. F., and Vernes, A. (1987). Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23, 193-201.

Dieckmann-Schuppert, A., Bause, E., and Schwarz, R. T. (1994). Glycosylation reactions in *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, and *Trypanosoma brucei brucei* probed by the use of synthetic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1199, 37-44.

Dong, W., Li, M., Bi, H., Li, Y., Wu, J., and Qu, L. (2001). Assessment of a vaccinia virus vectored multi-epitope live vaccine candidate for *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 31, 57-62.

Doolan, D. L., and Hoffman, S. L. (2001). DNA-based vaccines against malaria: status and promise of the Multi-Stage Malaria DNA Vaccine Operation. *Int J Parasitol* 31, 753-62.

Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-45.

Eder, J. P., Kantoff, P. W., Roper, K., Xu, G. X., Bubley, G. J., Boyden, J., Gritz, L., Mazzara, G., Oh, W. K., Arlen, P., Tsang, K. Y., Panicali, D., Schlom, J., and Kufe, D. W. (2000). A phase I trial of a recombinant vaccinia virus expressing prostate-specific antigen in advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6, 1632-8.

Elloso, M. M., van der Heyde, H. C., vande Waa, J. A., Manning, D. D., and Weidanz, W. P. (1994). Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells. *J Immunol* 153, 1187-94.

Etlinger, H. M., and Altenburger, W. (1991). Overcoming inhibition of antibody responses to a malaria recombinant vaccinia virus caused by prior exposure to wild type virus. *Vaccine* 9, 470-2.

Fell, A. H., Currier, J., and Good, M. F. (1994). Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth in vitro by CD4+ and CD8+ T cells from non-exposed donors. *Parasite Immunol* 16, 579-86.

- Foley, M., Tilley, L., Sawyer, W. H., and Anders, R. F. (1991). The ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* associates with spectrin in the erythrocyte membrane. *Mol Biochem Parasitol* 46, 137-47.
- French, N., Nakiyingi, J., Lugada, E., Watera, C., Whitworth, J. A., and Gilks, C. F. (2001). Increasing rates of malarial fever with deteriorating immune status in HIV-1-infected Ugandan adults. *Aids* 15, 899-906.
- Früh, K., Doumbo, O., Müller, H.-M., Koita, O., McBride, J., Crisanti, A., Touré, Y., and Bujard, H. (1991). Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* is strain specific and short-lived. *Infect. Immun.* 59, 1319-1324.
- Genton, B., Al-Yaman, F., Anders, R., Saul, A., Brown, G., Pye, D., Irving, D. O., Briggs, W. R., Mai, A., Ginny, M., Adiguma, T., Rare, L., Giddy, A., Reber-Liske, R., Stuerchler, D., and Alpers, M. P. (2000). Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine in adults living in an endemic area of Papua New Guinea. *Vaccine* 18, 2504-11.
- Giavedoni, L. D., Planelles, V., Haigwood, N. L., Ahmad, S., Kluge, J. D., Marthas, M. L., Gardner, M. B., Luciw, P. A., and Yilma, T. D. (1993). Immune response of rhesus macaques to recombinant simian immunodeficiency virus gp130 does not protect from challenge infection. *J Virol* 67, 577-83.
- Gibson, H. L., Tucker, J. E., Kaslow, D. C., Krettli, A. U., Collins, W. E., Kiefer, M. C., Bathurst, I. C., and Barr, P. J. (1992). Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50, 325-333.
- Gilbert, S. C., Schneider, J., Plebanski, M., Hannan, C. M., Blanchard, T. J., Smith, G. L., and Hill, A. V. (1999). Ty virus-like particles, DNA vaccines and Modified Vaccinia Virus Ankara; comparisons and combinations. *Biol Chem* 380, 299-303.
- Good, M. F., Kaslow, D. C., and Miller, L. H. (1998). Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol* 16, 57-87.
- Guevara Patino, J. A., Holder, A. A., McBride, J. S., and Blackman, M. J. (1997). Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies. *J Exp Med* 186, 1689-99.
- Gumpert, J., and Taubeneck, U. (1983). Characteristic properties and biological significance of stable protoplast type L-forms. *Experientia Suppl* 46, 227-41.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-9.

Helmby, H., Cavelier, L., Pettersson, U., and Wahlgren, M. (1993). Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface. *Infect. Immun.* *61*, 284-288.

Herrera, M. A., Rosero, F., Herrera, S., Caspers, P., Rotmann, D., Sinigaglia, F., and Certa, U. (1992). Protection against malaria in *Aotus* monkeys immunized with a recombinant blood-stage antigen fused to a universal T-cell epitope: correlation of serum gamma interferon levels with protection. *Infect. Immun.* *60*, 154-158.

Herrera, S., Herrera, M. A., Perlaza, B. L., Burki, Y., Caspers, P., Dobeli, H., Rotmann, D., and Certa, U. (1990). Immunization of *Aotus* monkeys with *Plasmodium falciparum* blood-stage recombinant proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 4017-4021.

Herrington, D. A., Clyde, D. F., Losonsky, G., Cortesia, M., Murphy, J. R., Davis, J., Baqar, S., Felix, A. M., Heimer, E. P., Gillessen, D., Nardin, E., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Hollingdale, M. R., and Levine, M. M. (1987). Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* *328*, 257-259.

Hirunpetcharat, C., Tian, J. H., Kaslow, D. C., van Rooijen, N., Kumar, S., Berzofsky, J. A., Miller, L. H., and Good, M. F. (1997). Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1[19]) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells. *J Immunol* *159*, 3400-11.

Hoffman, S. L., Oster, C. N., Plowe, C. V., Woollett, G. R., Beier, J. C., Chulay, J. D., Wirtz, R. A., Hollingdale, M. R., and Mugambi, M. (1987). Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. *Science*. *237*, 639-642.

Holder, A. A., and Freeman, R. R. (1982). Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* *156*, 1528-1538.

Holder, A. A., and Freeman, R. R. (1981). Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature*. *294*, 361-364.

Holder, A. A., Lockyer, M. J., Odink, K. G., Sandhu, J. S., Riveros-Moreno, V., Nicholls, S. C., Hillman, Y., Davey, L. S., Tizard, M. L. V., Schwarz, R. T., and Freeman, R. R. (1985). Primary structure of the precursor to three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature*. *317*, 270-273.

Hollingdale, M. R., Aikawa, M., Atkinson, C. T., Ballou, W. R., Chen, G. X., Li, J., Meis, J. F., Sina, B., Wright, C., and Zhu, J. D. (1990). Non-CS pre-erythrocytic protective antigens. *Immunol Lett* 25, 71-6.

Holzer, G. W., Remp, G., Antoine, G., Pflaiderer, M., Enzersberger, O. M., Emsenhuber, W., Hammerle, T., Gruber, F., Urban, C., Falkner, F. G., and Dorner, F. (1999). Highly efficient induction of protective immunity by a vaccinia virus vector defective in late gene expression. *J Virol* 73, 4536-42.

Howard, R. J. (1988). Malarial proteins at the membrane of *P. falciparum*-infected erythrocytes and their involvement in cytoadherence to endothelial cells. *Prog. Allergy* 41, 98-147.

Howard, R. J., and Gilladoga, A. D. (1989). Molecular studies related to the pathogenesis of cerebral malaria. *Blood* 74, 2603-18.

Hu, S. L., Abrams, K., Barber, G. N., Moran, P., Zarlino, J. M., Langlois, A. J., Kuller, L., Morton, W. R., and Benveniste, R. E. (1992). Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science* 255, 456-9.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-8.

Israel, Z. R., Edmonson, P. F., Maul, D. H., O'Neil, S. P., Mossman, S. P., Thiriart, C., Fabry, L., Van Opstal, O., Bruck, C., Bex, F., and et al. (1994). Incomplete protection, but suppression of virus burden, elicited by subunit simian immunodeficiency virus vaccines. *J Virol* 68, 1843-53.

Jakobsen, P. H., Moon, R., Ridley, R. G., Bate, C. A., Taverne, J., Hansen, M. B., Takacs, B., Playfair, J. H., and McBride, J. S. (1993). Tumour necrosis factor and interleukin-6 production induced by components associated with merozoite proteins of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol* 15, 229-237.

Jennings, G. J., Toebe, C. S., van Belkum, A., and Wiser, M. F. (1998). The complete sequence of *Plasmodium berghei* merozoite surface protein-1 and its inter- and intra-species variability. *Mol Biochem Parasitol* 93, 43-55.

Jouin, H., Rogier, C., Trape, J. F., and Mercereau-Puijalon, O. (2001). Fixed, epitope-specific, cytophilic antibody response to the polymorphic block 2 domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSP-1 in humans living in a malaria-endemic area. *Eur J Immunol* 31, 539-50.

Kanesa-thasan, N., Smucny, J. J., Hoke, C. H., Marks, D. H., Konishi, E., Kurane, I., Tang, D. B., Vaughn, D. W., Mason, P. W., and Shope, R. E. (2000). Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus--poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* 19, 483-91.

Kaslow, D. C. (1997). Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int J Parasitol* 27, 183-9.

Keitel, W. A., Kester, K. E., Atmar, R. L., White, A. C., Bond, N. H., Holland, C. A., Krzych, U., Palmer, D. R., Egan, A., Diggs, C., Ballou, W. R., Hall, B. F., and Kaslow, D. (1999). Phase I trial of two recombinant vaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (msp-1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid. *Vaccine* 18, 531-9.

Khusmith, S., Sedegah, M., and Hoffman, S. L. (1994). Complete protection against *Plasmodium yoelii* by adoptive transfer of a CD8+ cytotoxic T-cell clone recognizing sporozoite surface protein 2. *Infect Immun* 62, 2979-83.

Klenerman, P., and Zinkernagel, R. M. (1998). Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature* 394, 482-5.

Knapp, B., Hundt, E., and Kupper, H. A. (1989). A new blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* transported to the erythrocyte surface. *Mol Biochem Parasitol* 37, 47-56.

Krzych, U., Lyon, J. A., Jareed, T., Schneider, I., Hollingdale, M. R., Gordon, D. M., and Ballou, W. R. (1995). T lymphocytes from volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens. *J Immunol* 155, 4072-7.

Kumar, S., Collins, W., Egan, A., Yadava, A., Garraud, O., Blackman, M. J., Guevara Patino, J. A., Diggs, C., and Kaslow, D. C. (2000). Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect Immun* 68, 2215-23.

Kumar, S., Yadava, A., Keister, D. B., Tian, J. H., Ohl, M., Perdue-Greenfield, K. A., Miller, L. H., and Kaslow, D. C. (1995). Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys. *Mol Med* 1, 325-32.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lanar, D. E., Tine, J. A., de Taisne, C., Seguin, M. C., Cox, W. I., Winslow, J. P., Ware, L. A., Kauffman, E. B., Gordon, D., Ballou, W. R., Paoletti, E., and Sadoff, J. C. (1996).

Attenuated vaccinia virus-circumsporozoite protein recombinants confer protection against rodent malaria. *Infect Immun* *64*, 1666-71.

Langford, C. J., Edwards, S. J., Smith, G. L., Mitchell, G. F., Moss, B., Kemp, D. J., and Anders, R. F. (1986). Anchoring a secreted plasmodium antigen on the surface of recombinant vaccinia virus-infected cells increases its immunogenicity. *Mol Cell Biol* *6*, 3191-9.

Laveran, A. (1880). Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. *Bull. Med. Soc. Med. Hosp. Paris* *17*, 158-164.

Lewis, A. P. (1989). Cloning and analysis of the gene encoding the 230-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *36*, 271-282.

Li, S., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Palese, P., Nussenzweig, R. S., and Zavala, F. (1993). Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8⁺ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 5214-8.

Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H. G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P. A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* *6*, 1348-54.

Ling, I. T., Ogun, S. A., and Holder, A. A. (1994). Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunol* *16*, 63-7.

Low, R. (1998). Nonradioactive northern blotting. *Methods Mol Biol* *86*, 77-86.

Lutz, R., and Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res* *25*, 1203-10.

Mackay, M., Goman, M., Bone, N., Hyde, J. E., Scaife, J., Certa, U., Stunnenberg, H., and Bujard, H. (1985). Polymorphism of the precursor for the major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites: studies at the genetic level. *EMBO J.* *4*, 3823-3829.

Majarian, W. R., Daly, T. M., Weidanz, W. P., and Long, C. A. (1984). Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* *132*, 3131-3137.

Matsumoto, S., Yukitake, H., Kanbara, H., and Yamada, T. (1999). Long-lasting protective immunity against rodent malaria parasite infection at the blood stage by recombinant BCG secreting merozoite surface protein-1. *Vaccine* *18*, 832-4.

Mattei, D., Hinterberg, K., and Scherf, A. (1992). Pf11-1 and Pf332: two giant proteins synthesized in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today* 8, 426-428.

Mayr, A., and Danner, K. (1978). Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions. *Dev Biol Stand* 41, 225-34.

Mayr, A., Stickl, H., Muller, H. K., Danner, K., and Singer, H. (1978). [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]* 167, 375-90.

McClain, D. J., Summers, P. L., Harrison, S. A., Schmaljohn, A. L., and Schmaljohn, C. S. (2000). Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine. *J Med Virol* 60, 77-85.

McKean, P. G., O'Dea, K., and Brown, K. N. (1993). Nucleotide sequence analysis and epitope mapping of the merozoite surface protein 1 from *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, 199-209.

Meyer, H., Sutter, G., and Mayr, A. (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* 72, 1031-8.

Mitchell, G. H., Richards, W. H. G., Voller, A., Dietrich, F. M., and Cohen, S. (1977). Merozoite vaccination of douroucouli monkeys against *falciparum* malaria. *Lancet* i, 1335.

Moran, P., and Caras, I. W. (1994). Requirements for glycosylphosphatidylinositol attachment are similar but not identical in mammalian cells and parasitic protozoa. *J Cell Biol* 125, 333-43.

Moss, B. (1990). Regulation of orthopoxvirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 163, 41-70.

Moss, B., Carroll, M. W., Wyatt, L. S., Bennink, J. R., Hirsch, V. M., Goldstein, S., Elkins, W. R., Fuerst, T. R., Lifson, J. D., Piatak, M., Restifo, N. P., Overwijk, W., Chamberlain, R., Rosenberg, S. A., and Sutter, G. (1996). Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol* 397, 7-13.

Moss, B., Smith, G. L., Gerin, J. L., and Purcell, R. H. (1984). Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature* 311, 67-9.

Myler, P. J. (1989). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the gp195 (MSA-1) gene from *Plasmodium falciparum* Palo Alto PLF-3/B11. *Nucleic Acids Res.* 17, 5401.

Nikodem, D., and Davidson, E. (2000). Identification of a novel antigenic domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 that specifically binds to human erythrocytes and inhibits parasite invasion, in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 108, 79-91.

O'Donnell, R. A., de Koning-Ward, T. F., Burt, R. A., Bockarie, M., Reeder, J. C., Cowman, A. F., and Crabb, B. S. (2001). Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med* 193, 1403-12.

Ockenhouse, C. F., Betageri, R., Springer, T. A., and Staunton, D. E. (1992). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. *Cell* 68, 63-9.

Ockenhouse, C. F., Sun, P. F., Lanar, D. E., Welde, B. T., Hall, B. T., Kester, K., Stoute, J. A., Magill, A., Krzych, U., Farley, L., Wirtz, R. A., Sadoff, J. C., Kaslow, D. C., Kumar, S., Church, L. W., Crutcher, J. M., Wizel, B., Hoffman, S., Lalvani, A., Hill, A. V., Tine, J. A., Guito, K. P., de Taisne, C., Anders, R., Ballou, W. R., and et al. (1998). Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 177, 1664-73.

Oeuvray, C., Bouharoun-Tayoun, H., Grass-Masse, H., Lepers, J. P., Ralamboranto, L., Tartar, A., and Druilhe, P. (1994). A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 *Suppl* 2, 77-80.

Oliveira-Ferreira, J., Miyahira, Y., Layton, G. T., Savage, N., Esteban, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Nussenzweig, R. S., Zavala, F., and Myahira, Y. (2000). Immunogenicity of Ty-VLP bearing a CD8(+) T cell epitope of the CS protein of *P. yoelii*: enhanced memory response by boosting with recombinant vaccinia virus. *Vaccine* 18, 1863-9.

Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., and Seed, B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58, 95-101.

Pan, W., Ravot, E., Tolle, R., Frank, R., Mosbach, R., Turbachova, I., and Bujard, H. (1999). Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum*: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 27, 1094-103.

- Perrin, L. H., Merkli, B., Loche, M., Chizzolini, C., Smart, J., and Richle, R. (1984). Antimalarial immunity in *Saimiri* monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. *J. Exp. Med.* *160*, 441-451.
- Peterson, G. M., Coppel, R. L., Moloney, M. B., and Kemp, D. J. (1988). Third form of the precursor to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 2664-2667.
- Peterson, M. G., Coppel, R. L., McIntyre, P., Langford, C. J., Woodrow, G., Brown, G. V., Anders, R. F., and Kemp, D. J. (1988). Variation in the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *27*, 291-301.
- Peterson, M. G., Marshall, V. M., Smythe, J. A., Crewther, P. E., Lew, A., Silva, A., Anders, R. F., and Kemp, D. J. (1989). Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 3151-3154.
- Plebanski, M., Gilbert, S. C., Schneider, J., Hannan, C. M., Layton, G., Blanchard, T., Becker, M., Smith, G., Butcher, G., Sinden, R. E., and Hill, A. V. (1998). Protection from *Plasmodium berghei* infection by priming and boosting T cells to a single class I-restricted epitope with recombinant carriers suitable for human use. *Eur J Immunol* *28*, 4345-55.
- Plebanski, M., and Hill, A. V. (2000). The immunology of malaria infection. *Curr Opin Immunol* *12*, 437-41.
- Pope, B., and Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* *24*, 536-7.
- Pye, D., Edwards, S. J., Anders, R. F., O'Brien, C. M., Franchina, P., Corcoran, L. N., Monger, C., Peterson, M. G., Vandenberg, K. L., Smythe, J. A., Westley, S. R., Coppel, R. L., Webster, T. L., Kemp, D. J., Hampson, A. W., and Langford, C. J. (1991). Failure of recombinant vaccinia viruses expressing *Plasmodium falciparum* antigens to protect *Saimiri* monkeys against malaria. *Infect. Immun.* *59*, 2403-2411.
- Riley, E. M., Allen, S. J., Wheeler, J. G., Blackman, M. J., Bennett, S., Takacs, B., Schonfeld, H. J., Holder, A. A., and Greenwood, B. M. (1992). Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* *14*, 321-337.
- Riley, E. M., Morris-Jones, S., Taylor-Robinson, A. W., and Holder, A. A. (1993). Lymphoproliferative responses to a merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: preliminary evidence for seasonal activation of CD8+/HLA-DQ-restricted suppressor cells. *Clin. Exp. Immunol.* *94*, 64-67.

Rodrigues, M., Li, S., Murata, K., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Bacik, I., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., Garcia-Sastre, A., Nussenzweig, R. S., and et al. (1994). Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J Immunol* *153*, 4636-48.

Rogerson, S. J., Chaiyaroj, S. C., Ng, K., Reeder, J. C., and Brown, G. V. (1995). Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med* *182*, 15-20.

Rolph, M. S., and Ramshaw, I. A. (1997). Recombinant viruses as vaccines and immunological tools. *Curr Opin Immunol* *9*, 517-24.

Ruangjirachuporn, W., Afzelius, B. A., Helmby, H., Hill, A. V., Greenwood, B. M., Carlson, J., Berzins, K., Perlmann, P., and Wahlgren, M. (1992). Ultrastructural analysis of fresh Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and their cytoadherence to human leukocytes. *Am J Trop Med Hyg* *46*, 511-9.

Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A., and Dwek, R. A. (2001). Glycosylation and the immune system. *Science* *291*, 2370-6.

Rzepczyk, C. M., Ramasamy, R., Mutch, D. A., Ho, P. C., Battistutta, D., Anderson, K. L., Parkinson, D., Doran, T. J., and Honeyman, M. (1989). Analysis of human T cell response to two Plasmodium falciparum merozoite surface antigens. *Eur J Immunol* *19*, 1797-802.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. *239*, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*, 2 nd Edition (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sandhu, J. S., and Kennedy, J. F. (1994). Expression of the merozoite surface protein gp195 in vaccinia virus. *Vaccine* *12*, 56-64.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *74*, 5463-5467.

Saul, A., Lawrence, G., Smillie, A., Rzepczyk, C. M., Reed, C., Taylor, D., Anderson, K., Stowers, A., Kemp, R., Allworth, A., Anders, R. F., Brown, G. V., Pye, D., Schoofs, P., Irving, D. O., Dyer, S. L., Woodrow, G. C., Briggs, W. R., Reber, R., and Sturchler, D. (1999). Human phase I vaccine trials of 3 recombinant asexual stage malaria antigens with Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine* *17*, 3145-59.

Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G. L., and Hill, A. V. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8⁺ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4, 397-402.

Scholl, S. M., Balloul, J. M., Le Goc, G., Bizouarne, N., Schatz, C., Kieny, M. P., von Mensdorff-Pouilly, S., Vincent-Salomon, A., Deneux, L., Tartour, E., Fridman, W., Pouillart, P., and Acres, B. (2000). Recombinant vaccinia virus encoding human MUC1 and IL2 as immunotherapy in patients with breast cancer. *J Immunother* 23, 570-80.

Sedegah, M., Jones, T. R., Kaur, M., Hedstrom, R., Hobart, P., Tine, J. A., and Hoffman, S. L. (1998). Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7648-53.

Sedegah, M., Weiss, W., Sacci, J. B., Jr., Charoenvit, Y., Hedstrom, R., Gowda, K., Majam, V. F., Tine, J., Kumar, S., Hobart, P., and Hoffman, S. L. (2000). Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus. *J Immunol* 164, 5905-12.

Shear, H. L. (1993). Transgenic and mutant animal models to study mechanisms of protection of red cell genetic defects against malaria. *Experientia* 49, 37-42.

Siddiqui, W. A., Tam, L. Q., Kramer, K. J., Hui, G. S., Case, S. E., Yamaga, K. M., Chang, S. P., Chan, E. B., and Kan, S. C. (1987). Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3014-3018.

Sim, B. K., Orlandi, P. A., Haynes, J. D., Klotz, F. W., Carter, J. M., Camus, D., Zegans, M. E., and Chulay, J. D. (1990). Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *J. Cell. Biol.* 111, 1877-1884.

Smythe, J. A., Coppel, R. L., Day, K. P., Martin, R. K., Oduola, A. M., Kemp, D. J., and Anders, R. F. (1991). Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1751-5.

Somner, E. A., Ogun, S. A., Sinha, K. A., Spencer Valero, L. M., Lee, J. J., Harrison, J. A., Holder, A. A., Hormaeche, C. E., and Khan, C. M. (1999). Expression of disulphide-bridge-dependent conformational epitopes and immunogenicity of the carboxy-terminal 19 kDa domain of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Microbiology* 145, 221-9.

- Staib, C., Drexler, I., Ohlmann, M., Wintersperger, S., Erfle, V., and Sutter, G. (2000). Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara. *Biotechniques* 28, 1137-42, 1144-6, 1148.
- Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H. C., Schafer, H., and Holzner, A. (1974). [MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]. *Dtsch Med Wochenschr* 99, 2386-92.
- Stoute, J. A., Slaoui, M., Heppner, D. G., Momin, P., Kester, K. E., Desmons, P., Wellde, B. T., Garcon, N., Krzych, U., and Marchand, M. (1997). A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med* 336, 86-91.
- Stowers, A. W., Cioce, V., Shimp, R. L., Lawson, M., Hui, G., Muratova, O., Kaslow, D. C., Robinson, R., Long, C. A., and Miller, L. H. (2001). Efficacy of two alternate vaccines based on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an Aotus challenge trial. *Infect Immun* 69, 1536-46.
- Stowers, A. W., Zhang, Y., Shimp, R. L., and Kaslow, D. C. (2001). Structural conformers produced during malaria vaccine production in yeast. *Yeast* 18, 137-50.
- Su, S., Sanadi, A. R., Ifon, E., and Davidson, E. A. (1993). A monoclonal antibody capable of blocking the binding of Pf200 (MSA-1) to human erythrocytes and inhibiting the invasion of *Plasmodium falciparum* merozoites into human erythrocytes. *J. Immunol.* 151, 2309-2317.
- Sutter, G., and Moss, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10847-51.
- Sutter, G., Wyatt, L. S., Foley, P. L., Bennink, J. R., and Moss, B. (1994). A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12, 1032-40.
- Tachado, S. D., Gerold, P., Schwarz, R., Novakovic, S., McConville, M., and 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* 94, 4022-7.
- Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M., and Scaife, J. G. (1987). Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 195, 273-287.

Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., and et al. (1992). NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188, 217-32.

Taylor-Robinson, A. W. (2000). Vaccination against malaria: targets, strategies and potentiation of immunity to blood stage parasites. *Front Biosci* 5, E16-29.

Tian, J. H., Miller, L. H., Kaslow, D. C., Ahlers, J., Good, M. F., Alling, D. W., Berzofsky, J. A., and Kumar, S. (1996). Genetic regulation of protective immune response in congenic strains of mice vaccinated with a subunit malaria vaccine. *J Immunol* 157, 1176-83.

Tine, J. A., Lanar, D. E., Smith, D. M., Welde, B. T., Schultheiss, P., Ware, L. A., Kauffman, E. B., Wirtz, R. A., De Taisne, C., Hui, G. S., Chang, S. P., Church, P., Hollingdale, M. R., Kaslow, D. C., Hoffman, S., Guito, K. P., Ballou, W. R., Sadoff, J. C., and Paoletti, E. (1996). NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 64, 3833-44.

Tolle, R., Fruh, K., Doumbo, O., Koita, O., N'Diaye, M., Fischer, A., Dietz, K., and Bujard, H. (1993). A prospective study of the association between the human humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stage antigen gp190 and control of malarial infections. *Infect Immun* 61, 40-7.

Türbachova, I. (2000). Synthese des Hauptoberflächenproteins MSP-1 aus *Plasmodium falciparum* in *Toxoplasma gondii*: Untersuchungen zur Struktur und Funktion

Uthaipibull, C., Aufiero, B., Syed, S. E., Hansen, B., Guevara Patino, J. A., Angov, E., Ling, I. T., Fegeding, K., Morgan, W. D., Ockenhouse, C., Birdsall, B., Feeney, J., Lyon, J. A., and Holder, A. A. (2001). Inhibitory and blocking monoclonal antibody epitopes on merozoite surface protein 1 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 307, 1381-94.

Wang, R., Doolan, D. L., Le, T. P., Hedstrom, R. C., Coonan, K. M., Charoenvit, Y., Jones, T. R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W. R., Sedegah, M., de Taisne, C., Norman, J. A., and Hoffman, S. L. (1998). Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 282, 476-80.

Weber, J. L., Leininger, W. M., and Lyon, J. A. (1986). Variation in the gene encoding a major merozoite surface antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.* 14, 3311-3323.

Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., and Mosmann, T. R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14, 353-6.

Weiss, W. R., Sedegah, M., Beaudoin, R. L., Miller, L. H., and Good, M. F. (1988). CD8+ T-cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 573-576.

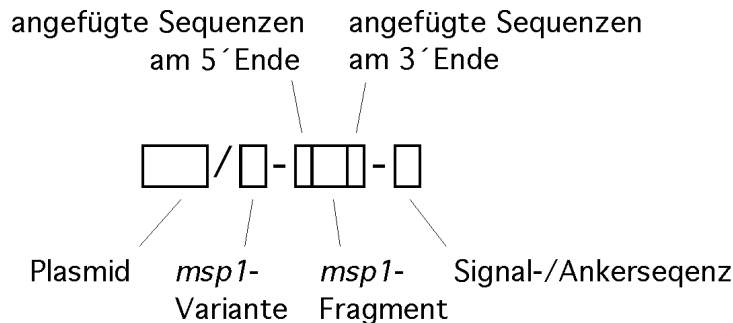
Wunderlich, G., Moura, I. C., and del Portillo, H. A. (2000). Genetic immunization of BALB/c mice with a plasmid bearing the gene coding for a hybrid merozoite surface protein 1-hepatitis B virus surface protein fusion protects mice against lethal *Plasmodium chabaudi chabaudi* PC1 infection. *Infect Immun* 68, 5839-45.

Yang, C., Collins, W. E., Sullivan, J. S., Kaslow, D. C., Xiao, L., and Lal, A. A. (1999). Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in Saimiri monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Infect Immun* 67, 342-9.

Yang, S., Carroll, M. W., Torres-Duarte, A. P., Moss, B., and Davidson, E. A. (1997). Addition of the MSA1 signal and anchor sequences to the malaria merozoite surface antigen 1 C-terminal region enhances immunogenicity when expressed by recombinant vaccinia virus. *Vaccine* 15, 1303-13.

Zevering, Y., Amante, F., Smillie, A., Currier, J., Smith, G., Houghten, R. A., and Good, M. F. (1992). High frequency of malaria-specific T cells in non-exposed humans. *Eur. J. Immunol.* 22, 689-696.

Nomenklatur der zur Klonierung von synthetischen *msp1*-Sequenzen verwendeten Plasmide



Plasmid: = Name des Grundvektors ohne *msp1*-Insertion, z.B. pZE21, pIIIIdHR.ssP, pBI-5

***msp1*-Variante:** ⇒ „d“ = synthetische *msp1*-Sequenzen des MAD20-Prototyps
 ⇒ „f“ = synthetische *msp1*-Sequenzen des k1-Prototyps

***msp1*-Fragment:** z.B.: „42“ für die synthetische DNA-Sequenz, die für p42 kodiert
 „38/42“ für die synthetische DNA-Sequenz, die für die Fusion aus p38 und p42 kodiert
 „190“ für die synthetische DNA-Sequenz, die für Gesamt-MSP1 kodiert

jeweils OHNE Signal- und Ankersequenzen

angefügte Sequenzen am 5' Ende

angefügte Sequenzen am 3' Ende:

z.B. zur Aufreinigung von MSP1:

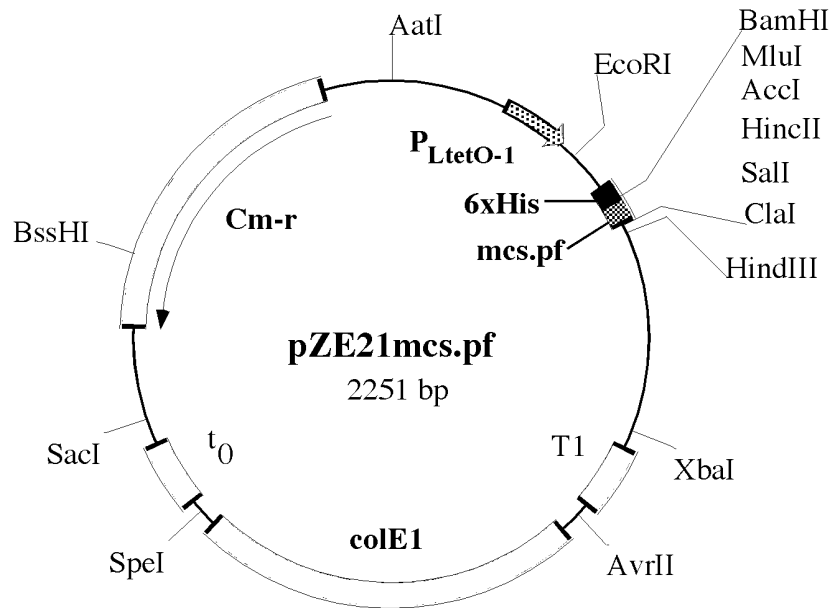
„H“ kodiert für 6 Histidine
 „HX“ kodiert für 6 Histidine gefolgt von einer Faktor-X-Schnittstelle
 „G“ kodiert für GST-Domäne
 „GX“ kodiert für GST-Domäne gefolgt von einer Faktor-X-Schnittstelle
 „S“ kodiert für „Strep-Tag“
 „SX“ kodiert für „Strep-Tag“ gefolgt von einer Faktor-X-Schnittstelle

Signal-/Ankersequenzen:

- 1 authentische Signalsequenz aus *P. falciparum*
- 2 authentische GPI-Ankersequenz aus *P. falciparum*
- 3 Signalsequenz des humanen DAF
- 4 GPI-Ankersequenz des humanen DAF
- 5 Signalsequenz des SAG-1 aus *T. gondii*
- 6 GPI-Ankersequenz des SAG-1 aus *T. gondii*
- 7 Signalsequenz des ompA aus *E. coli*
- 8 Stoptransfersequenz zur Verankerung von Proteinen auf der Oberfläche der Plasmamembran von Prokaryoten

Kombination werden vom N- zum C-Terminus angegeben und durch Komma getrennt

Prokaryotische Expressionsplasmide



pZE21mcs.pf =pZE21/...-H...	ColE1; Kanamycinresistenz; PtetO – ATG – 6xHis - BamHI,MluI...ClaI => 6xHis + MSP1 im Zytoplasma
pZE21(-tag) =pZE21/...	ColE1; >Cm-r; PtetO – ATG – BamHI, MluI...ClaI => MSP1 im Zytoplasma
pZE21ompA =pZE21/...-...-7	ColE1; Cm-r; PtetO – ATGompA – BamHI, MluI...ClaI => MSP1 im Periplasma => in „L-Form“-Bakt.: Sekretion in Medium
pZE21ompA/6xHis =pZE21/...-H...-7	ColE1; Cm-r; PtetO – ATGompA – 6xHis – BamHI, MluI... ClaI => 6xHis + MSP1 im Periplasma => in „L-Form“-Bakt.: Sekretion in Medium
pZE21ompA.p19stop =pZE21/...-...-7,8	ColE1; Cm-r; PtetO – ATGompA –BamHI p19(-pf.gpi) – Stoptransfer – ClaI => 6xHis + MSP1 im Periplasma, verankert in Plasmamembran via Stopptansfersequenz. => in „L-Form“-Bakt.: MSP1 verankert auf Oberfläche

msp1 in pZE21mcs.pf:

- K1: pZE21/f-H190-1,2
pZE21/f-H190-2
pZE21/f-H190
pZE21/f-H42
pZE21/f-H19*
- 3D7: pZE21/d-H190-2
pZE21/d-H190*
pZE21/d-H83
pZE21/d-H83/30
pZE21/d-H30
pZE21/d-H38
pZE21/d-H38/42-2
pZE21/d-H38/42*
pZE21/d-H42-2
pZE21/d-H42*
pZE21/d-H19*

msp1 in pZE21ompA:

- k1: pZE21/f-190-7
pZE21/f-19*-7
- 3D7: pZE21/d-190-7,2
pZE21/d-190*-7
pZE21/d-83-7
pZE21/d-83/30-7
pZE21/d-38/42*-7
pZE21/d-42-7,2
pZE21/d-42*-7
pZE21/d-19*-7

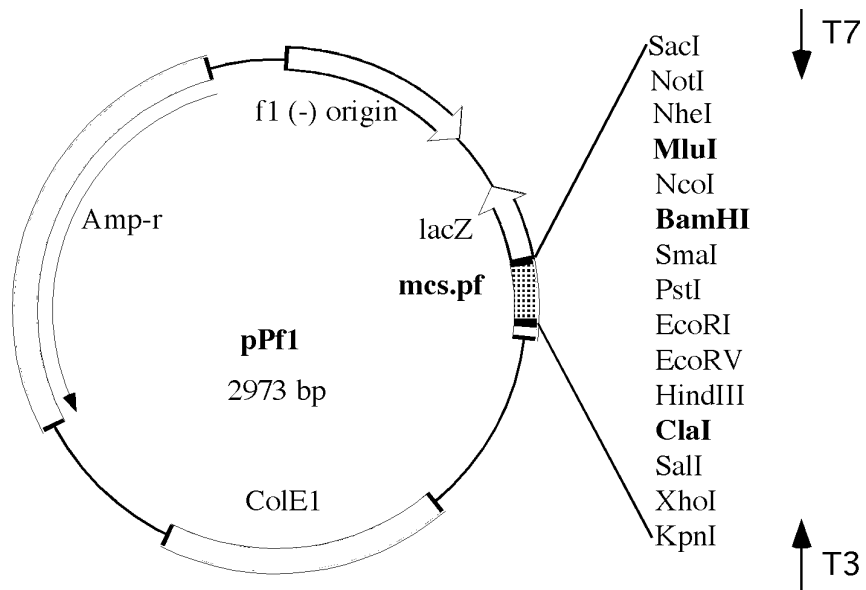
msp1 in pZE21ompA/6xHis:

- k1: pZE21/f-H19*-7
- 3D7: pZE21/d-H190*-7
pZE21/d-H42*-7
pZE21/d-H19*-7

msp1 in pZE21ompA.p19stop:

- k1: pZE21/f-19-7,8
- 3D7: pZE21/d-190-7,8 => Jena
pZE21/d-42-7,8
pZE21/d-19-7,8

msp1 in pPf1



3D7:

- pPf1/d-190-1,2
- pPf1/d-190-2
- pPf1/d-83I-1
- pPf1/d-83II
- pPf1/d-83III
- pPf1/d-83-1
- pPf1/d-83
- pPf1/d-83/30-1
- pPf1/d-30
- pPf1/d-38
- pPf1/d-38/42-2
- pPf1/d-42-2
- pPf1/d-19-2

Vaccinia-Viren:

Grundvektoren: pIIIIdHR.ssP
pIIIIdHR.7.5

Beispiele für Plasmidkarten finden sich in Abb. 5.8

3D7:

pIIIIdHR.ssP:

kein Translations-Initiations-Kodon!

pIIIIdHR.ssP/d-190-2
pIIIIdHR.ssP/d-42/38*
pIIIIdHR.ssP/d-42*

Integartionsvektoren:

Alte Nomenclatur:

pIIIIdHR.ssP/d-190-3,2 (= pIIIIdHR.ssP.DAFsig.p190(-sp;+pf.gpi))
pIIIIdHR.ssP/d-190*-3 (= pIIIIdHR.ssP.DAFsig.p190(-sp;*-gpi))
pIIIIdHR.ssP/d-190-3,4 (= pIIIIdHR.ssP.DAFsig.p190DAFgpi(-sp;*-gpi))
pIIIIdHR.ssP/d-42*-3 (= pIIIIdHR.ssP.DAFsig.p42(*-gpi))
pIIIIdHR.ssP/d-42-3,4 (= pIIIIdHR.ssP.DAFsig.p42.DAFgpi(*-gpi))
pIIIIdHR.ssP/d-38/42*-3 (= pIIIIdHR.ssP.DAFsig.p38/42(-sp;*-gpi))
pIIIIdHR.ssP/d-38/42-3,4 (= pIIIIdHR.ssP.DAFsig.p38/42.DAFgpi(*-gpi))

k1:

pIIIIdHR.ssP/f-38/42-3,4
pIIIIdHR.ssP/f-190-3,4

Masernviren:

Plasmide, die nach Zürich geschickt wurden zur Konstruktion rekombinanter Masernviren

3D7:

pZE21/d-190*-7,3 = DAFsig.p190(-sp;*-gpi)
pZE21/d-190-7,3,4 = DAFsig.p190.DAFgpi (-sp;*-gpi)
pZE21/d-42*-7,3 = DAFsig.p42(*-gpi)
pZE21/d-42-7,3,4 = DAFsig.p42.DAFgpi (*-gpi)

Generelle Anmerkungen:

(-gpi) = kein pf.gpi
* oder (*-gpi) = kein pf.gpi aber neueingefügte AclI-Schnittstelle zur Insertion alternativer Ankersequenzen
(-sp) = keine pf.signalsequenz