

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplombiologin Kirsten Heiß  
aus Freiburg

Tag der mündlichen Prüfung:

## **Thema**

**Funktionelle Charakterisierung von TRAP-Invasinen in  
*Plasmodium*  
und Identifizierung eines potentiellen Invasins in  
Merozoiten**

Gutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer  
Prof. Dr. Markus Simon

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Parasitologie des Hygiene-Instituts der Universität Heidelberg im Zeitraum von September 2002 bis Januar 2006 unter Anleitung von Dr. Kai Matuschewski durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind als Manuskript zur Publikation in Vorbereitung:

Heiss K., Daly T. M., Bergman L. W., Matuschewski K.

**Identification of a TRAP-like Protein with a Vital Role in *Plasmodium* Blood Stages**

Krisen sind Angebote des Lebens, sich zu wandeln.

Man braucht noch gar nicht zu wissen,  
was neu werden soll, man muss nur  
bereit und zuversichtlich sein.

## Danksagungen

Ganz herzlich möchte ich mich bei **Kai Matuschewski**, für die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen, bedanken. Insbesondere für die tolle Betreuung, sein ständig offenes Ohr für alle Fragen und Probleme, seine Unterstützung, die vielen Ideen und Anregungen aber auch die Freiheit, den eigenen Fragestellungen nachzugehen, möchte ich mich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. **Michael Lanzer** möchte ich mich besonders für die Aufnahme in seine Abteilung und die Bereitschaft, das Erstgutachten zu übernehmen, bedanken.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. **Markus Simon** für die sofortige Bereitschaft das Zweitgutachten meiner Arbeit zu übernehmen.

Herzlichen Dank an **Bill Bergman** für die gute Zusammenarbeit, die einiges zu dieser Arbeit beigetragen hat.

**Ann-Kristin**, vielen lieben Dank für alles. Danke für deine Unterstützung in vielerlei Hinsicht, die mir vieles ermöglicht hat, und für deine Freundschaft. Mit dir und neben dir zu arbeiten hat sehr viel zu dieser Arbeit beigetragen.

Vielen lieben Dank an **Jan**, der sich mit all meinen Computer-Fragen mit Geduld auseinandergesetzt hat.

Allen **meinen Freunden**, die mich während der letzten Jahre begleitet haben, ein herzliches Dankeschön. Vielen Dank **Ann-Kristin, Nina, Kerstin & Markus, Daniel, Heiko** und **Markus** das ihr, vor allem die letzten Monate, für mich da gewesen seid.

Allen Mitarbeitern **meiner Arbeitsgruppe** möchte ich ganz herzlich danken, die mich jeder auf seine Weise unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen lieben Dank **Andreas**, nicht nur für die Gestaltung des Titelbildes, sondern auch für die Hilfe bei vielen Experimenten.

Vielen Dank für die Hilfsbereitschaft der **Arbeitsgruppe Lanzer** beim Erlernen der *P. falciparum*-Kultur. Danke **Elli** und **Marina** für die Beantwortung aller Fragen und der Bereitschaft, immer mal „schnell“ einen Blick unter einen Blutausstrich zu werfen.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt **meinen Eltern**, die mich immer unterstützt haben, meinen Weg zu gehen, und immer für mich da sind.

**Meinen Eltern**

## Abkürzungen

$\alpha$	anti, gegen
A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
<i>An. stephensi</i>	<i>Anopheles stephensi</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
°C	Grad Celsius
CS-Protein	Circumsporozoiten-Protein ( <i>circumsporozoite protein</i> )
cDNA	komplementäre DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTD	<i>cytoplasmic tail domain</i> (zytoplasmatische Domäne)
CTRP	<i>circumsporozoite- and TRAP-related protein</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Da	Dalton
$\Delta$	Deletion, Delta
ddH <sub>2</sub> O	zweimal destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>DHFR/TS</i> -Gen	Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthetase-Gen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FD	Farad
for	<i>forward</i> , in <i>sense</i> Richtung des Gens
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
IFA	Indirekter Immunfluoreszenz-Assay



IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl-1 thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
IMC	<i>inner membrane complex</i>
kb	Kilobasenbaare
kDa	Kilodalton
LiAc	Lithiumacetat
l	Liter
LB	Luria-Broth-Medium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
m	Meter, Milli- ( $10^{-3}$ )
$\mu$	Mikro- ( $10^{-6}$ )
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
N-Terminus	Amino-Terminus
pABA	4-Aminobenzoessäure
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>Py</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , pH-Wert
rev	<i>revers</i> , in <i>antisense</i> Richtung des Gens
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s.i.	Sporozoit-induziert

SD	Standardabweichung, Sprague-Dawley-Ratten,
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
TLP1	<i>TRAP-like protein 1</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	<i>thrombospondin-related anonymous protein</i>
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
TSR	<i>thrombospondin type I repeat</i>
U	Unit, definierte biochemische Einheit für Enzymaktivität
UTR	<i>untranslated region</i> (nicht-translatierte Region)
V	Volt
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsvolumenprozent
Y2H	<i>Yeast-two-hybrid</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Malaria	1
1.1.1 Pathologie der Malaria	4
1.1.2 Der <i>Plasmodium</i> -Lebenszyklus	5
1.1.3 Der <i>Plasmodium</i> -Vektor: <i>Anopheles</i> -Mücken	9
1.2 Invasion von <i>Apicomplexa</i>	10
1.2.1 Gleitbewegung und Invasion	10
1.2.2 Die TRAP-Proteinfamilie	11
1.2.3 Die Motormaschinerie	14
1.3 Stadien-spezifische Proteine der invasiven Stadien	17
1.3.1 Sporozoiten	17
1.3.2 Ookineten	20
1.3.3 Merozoiten	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit	26
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1 Materialien	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	29
2.1.3 Chemikalien und Materialien	30
2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen	32
2.1.4.1 Biochemisches Arbeiten	32
2.1.4.1.1 SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting	32
2.1.4.1.2 Proteinüberexpression	33
2.1.4.1.3 <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -System	33
2.1.4.2 Mikrobiologisches Arbeiten	34
2.1.4.2.1 Antibiotika	34
2.1.4.2.2 Bakterien-Medien	34
2.1.4.3 Molekularbiologisches Arbeiten	35
2.1.4.4 Parasiten-Medien	35
2.1.4.5 Zellkultur	35

2.1.4.6 Mosquito-Aufzucht	36
2.1.5 Größenmarker und Ladepuffer für Elektrophorese	36
2.1.6 Stämme und Vektoren	36
2.1.6.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	36
2.1.6.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	37
2.1.6.3 Maus- und Ratten-Stämme	38
2.1.6.4 Mosquito-Stämme	38
2.1.6.5 Parasiten-Stämme	39
2.1.6.6 Zelllinien	39
2.1.6.7 Vektoren	39
2.1.6.7.1 <i>Plasmodium berghei</i> -Vektoren	39
2.1.6.7.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Vektoren	39
2.1.6.7.3 Vektor zur Proteinüberexpression	40
2.1.6.7.4 Vektor zur Sequenzierung eines PCR-Fragments	40
2.1.7 Antikörper	40
2.1.7.1 Verwendete primäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen	40
2.1.7.2 Verwendete sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen	40
2.1.7.3 Verwendete primäre Antikörper für Western-Blot-Analysen	41
2.1.7.4 Verwendete sekundäre Antikörper für Western-Blot-Analysen	41
2.1.8 Enzyme	41
2.1.8.1 Molekularbiologisches Arbeiten	41
2.1.8.2 Biochemisches Arbeiten	42
2.1.9 Kits	42
2.1.10 Oligonukleotide	42
2.1.11 DNA-Sequenzierungen	45
2.2 Methoden	46
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	46
2.2.1.1 Kultur und Transformation prokaryontischer Zellen	46
2.2.1.1.1 Flüssigkulturen von <i>E.coli</i> -Bakterien	46
2.2.1.1.2 Plattenkulturen	46
2.2.1.1.3 Herstellung einer Bakterien-Dauerkultur	46
2.2.1.1.4 Transformation kompetenter Bakterienzellen	46
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	47
2.2.2.1 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren	47

2.2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen	47
2.2.2.1.2 Alkoholfällung von DNA	48
2.2.2.1.3 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA	48
2.2.2.1.4 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen	49
2.2.2.1.5 Sequenzierung	49
2.2.2.1.6 Computergestützte Sequenzanalysen	49
2.2.2.2 <i>In vitro</i> -Modifikation und Rekombination von DNA	50
2.2.2.2.1 DNA-Restriktion	50
2.2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
2.2.2.2.3 Ligationen	52
2.2.2.3 Isolierung und Analyse von RNA	52
2.2.2.3.1 mRNA-Isolierung	52
2.2.2.3.2 DNaseI-Verdau der isolierten mRNA-Präparation	52
2.2.2.3.3 Reverse Transkription (RT) von mRNA zu einem RNA/DNA-Hybrid	53
2.2.3 <i>Plasmodium berghei</i> -Methoden	54
2.2.3.1 Mikroskopische Darstellung von <i>P. berghei</i> mittels Giemsa-Färbung und Bestimmung der Parasitämie	54
2.2.3.2 Untersuchung der Exflagellation von <i>P. berghei</i> -Gametozyten	54
2.2.3.3 Transfektion von <i>Plasmodium berghei</i>	55
2.2.3.3.1 Präparation der Parasiten und <i>in vitro</i> -Kultivierung der Erythrozyten-Stadien für die Transfektion	56
2.2.3.3.2 Vorbereitung des Transfektionsvektors	56
2.2.3.3.3 Aufreinigung und Elektroporation der Schizonten	56
2.2.3.3.4 Parasiten-Selektion	57
2.2.3.3.5 Herstellung von <i>P. berghei</i> -Blutstabilaten	58
2.2.3.3.6 Isolierung von Parasiten aus Ratten- bzw. Mäuse-Blut und Präparation der genomischen DANN	58
2.2.3.3.7 Klonierung von Parasiten	59
2.2.3.4 Herstellung von blutstadienspezifischer Proteinextrakten	60
2.2.3.5 Anreicherung von <i>P. berghei</i> -Gametozyten für die Herstellung von Proteinextrakten	61
2.2.3.6 Herstellung von <i>Plasmodium berghei</i> - Sporozoiten Proteinextrakten	62

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden	62
2.2.4.1 Anästhesie und Blutentnahme von Ratten und Mäusen	62
2.2.4.2 Applikationsmethoden	62
2.2.5 Zellkultur	62
2.2.5.1 <i>Plasmodium falciparum</i> -Methoden	62
2.2.5.1.1 Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i>	62
2.2.5.1.2 Aufbereitung des humanen Serums	63
2.2.5.1.3 Aufbereitung der humanen Erythrozyten	63
2.2.5.1.4 Mikroskopische Darstellung von <i>P. falciparum</i> mittels Giemsa-Färbung und Bestimmung der Parasitämie	63
2.2.5.1.5 Einfrieren und Auftauen von Parasiten	64
2.2.5.1.6 Synchronisierung von <i>P. falciparum</i> -Kulturen mit Sorbitol	64
2.2.5.1.7 Anreicherung von <i>P. falciparum</i> -Schizonten durch magnetische Separation	65
2.2.5.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen	65
2.2.5.2.1 Bestimmung der Zellzahl	66
2.2.5.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen	66
2.2.6 <i>Anopheles</i> -Moskito-Methoden	67
2.2.6.1 Bestimmung der Sporozoitenzahl	68
2.2.7 Zellbiologische Methoden	68
2.2.7.1 Immunfluoreszenz-Färbungen	68
2.2.7.1.1 <i>Gliding Motility</i> -Assay der <i>Plasmodium berghei</i> -Sporozoiten	68
2.2.7.1.2 <i>EEF-development</i> -Assay mit <i>Plasmodium berghei</i> -Sporozoiten	69
2.2.7.2 Mikroskopie	70
2.2.7.2.1 Immunofluoreszenz-Mikroskopie	70
2.2.7.2.2 Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie	70
2.2.8 Biochemische Methoden	71
2.2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	71
2.2.8.2 Coomassie-Färbung	72
2.2.8.3 Western-Blot-Analysen	73
2.2.8.4 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit dem <i>yeast-two-hybrid</i> -System	73
2.2.8.4.1 Konstruktion der „Fänger“-( <i>bait</i> ) Plasmide	75
2.2.8.4.2 Transfektion von Hefezellen	75

2.2.8.4.3 Proteinextraktion aus Hefezellen	76
2.2.8.4.4 Herstellung der cDNA-Bibliothek für das <i>yeast-two-hybrid screening</i>	77
2.2.8.4.5 <i>Yeast-two-hybrid screening</i> mittels Ko-Transfektion	80
2.2.8.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe	82
2.2.8.4.7 Analyse direkter Protein-Protein-Interaktionen mit dem <i>Two-hybrid</i> -System	82
2.2.8.5 Proteinüberexpression	84
2.2.8.5.1 Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E.coli (small-scale)</i>	84
2.2.8.5.2 Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen in <i>E.coli (large-scale)</i>	84
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>87</b>
3.1 Identifizierung eines neuen Mitglieds der TRAP-Proteinfamilie in <i>Plasmodium</i>	87
3.1.1 Analyse der TRAP-Expression während des <i>Plasmodium berghei</i> -Lebenszyklus	87
3.1.2 Das <i>Plasmodium</i> -Genom enthält ein weiteres TRAP-ähnliches Protein	90
3.1.3 TLP1 ist in den erythrozytären Stadien von <i>Plasmodium</i> exprimiert	93
3.1.4 Herstellung eines <i>Plasmodium berghei</i> TLP1-Antiserums	93
3.1.4.1 Konstruktion der Überexpressionskonstrukte	93
3.1.4.2 Ergebnisse aus den Test-Experimenten	94
3.1.4.3 Aufreinigung der überexprimierten GST-TLP1-Fusion	95
3.1.4.4 Konzentrationsbestimmung der gereinigten GST-TLP1-Fusion	96
3.1.4.5 Immunisierung und Test des gewonnenen TLP1-Anti-Serums	96
3.1.5 Expressionsanalyse von TLP1	99
3.2 Funktionelle Identifizierung von Invasinen der TRAP-Proteinfamilie	105
3.2.1 Herstellung von <i>P.berghei</i> TRAP-CTD- <i>swap</i> -Parasiten	106
3.2.1.1 Konstruktion der Transfektionsvektoren für die TRAP-CTD Komplementationen	106
3.2.1.2 Gewinnung der TRAP-CTD-Parasiten mit Hilfe des <i>P. berghei</i> – Transfektionssystem	107
3.2.1.3 Genotypische Analyse der TRAP-CTD- <i>swap</i> -Parasiten	110
3.2.2 Phänotypische Charakterisierung der <i>P. berghei</i> TRAP-CTD- <i>swap</i> -Parasiten	111
3.2.2.1 Der Austausch der zytoplasmatischen Domäne hat keinen Einfluss auf die Expression von TRAP	112

3.2.2.2 Die TLP1-CTD-Mutante zeigt eine reduzierte Invasion in die Speicheldrüse im Moskito-Vektor	113
3.2.2.3 Die TLP1-CTD- <i>swap</i> -Mutante infiziert den Säugetier-Wirt <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	114
3.2.2.4 Die TLP1-CTD- <i>swap</i> -Mutante zeigt einen reduzierten <i>gliding motility</i> -Phänotyp	117
3.2.3 Die zytoplasmatische Domäne von TLP1 bindet Aldolase <i>in vitro</i>	118
3.2.4 <i>In vivo</i> -Analyse der Interaktion zwischen TLP1-CTD und Aldolase mit dem <i>yeast-two-hybrid</i> -System	119
3.3 Identifizierung möglicher Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne von TLP1 mit dem <i>yeast-two-hybrid</i> -System	125
3.4 TLP1 ist essentiell für die erythrozytären Stadien	129
3.4.1 Konstruktion der Transfektionsvektoren pKH11 und pKH12 und Transfektion	131
3.5 Funktionelle Trennung von EBA175 von den Invasinen der TRAP-Proteinfamilie	137
3.5.1 Herstellung der <i>P. berghei</i> TRAP/EBA175-CTD- <i>swap</i> -Parasiten	138
3.5.1.1 Konstruktion der Transfektionsvektoren für die TRAP/EBA175-CTD-Komplementationen	138
3.5.1.2 Gewinnung der TRAP/EBA175-CTD- <i>swap</i> -Parasiten	138
3.5.1.3 Genotypische Analyse der TRAP/EBA175-CTD- <i>swap</i> -Parasiten	139
3.5.2 Phänotypische Charakterisierung der <i>P. berghei</i> TRAP/EBA175- <i>swap</i> -Parasiten	140
3.5.2.1 Die EBA175-CTD-Mutanten zeigen ein deutlich reduziertes Invasionsverhalten in die Speicheldrüsen im Moskito-Vektor	141
3.5.2.2 <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Invasion des Säugetier-Wirts durch die EBA175-CTD- <i>swap</i> -Mutanten	142
3.6 MTI-1: Ein weiteres TRAP-ähnliches Invasin?	144
3.6.1 Herstellung der <i>P. berghei</i> TRAP/MTI-1-CTD- <i>swap</i> -Parasiten	146
3.6.1.1 Konstruktion der Transfektionsvektoren für die TRAP/MTI-1-CTD-Komplementationen	146
3.6.1.2 Gewinnung und Genotypisierung der TRAP/MTI-1-CTD- <i>swap</i> -Parasiten	146
3.6.2 Phänotypische Analyse der <i>P. berghei</i> TRAP/MTI-1-CTD- <i>swap</i> -Parasiten	147



3.6.2.1 Die TRAP/MTI-1-CTD-Mutanten zeigen ein mit den TRAP/EBA175-CTD-Mutanten vergleichbares Invasionsverhalten in die Speicheldrüsen von <i>An. stephensi</i>	148
3.6.2.2 Infektion von Hepatozyten durch die MTI-1-CTD-swap-Parasiten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	149
<b>4. Diskussion und Addendum</b>	<b>151</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>163</b>
<b>6. Summary</b>	<b>165</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>166</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Malaria

Malaria ist eine der häufigsten Tropenkrankheiten und zugleich die Infektionskrankheit, die zusammen mit AIDS und Tuberkulose die meisten Todesopfer fordert. Heutzutage ist Malaria hauptsächlich in den tropischen und subtropischen Regionen der Welt zu finden und tritt dort in über hundert Ländern endemisch auf. Mehr als 40% der Weltbevölkerung lebt in Gebieten, in denen Malaria endemisch vorkommt. Zu diesen Gebieten zählen große Teile Afrikas, Asiens und Südamerika (Abbildung 1.1). Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erkrankten weltweit über 300 Millionen Menschen pro Jahr an Malaria, wovon mehr als eine Millionen sterben. Diese Todesfälle treten zu 90% in Afrika, in südlich der Sahara gelegenen Regionen auf, und hier sind meist Kinder unter 5 Jahren und schwangere Frauen betroffen. Alle 30 Sekunden stirbt in Afrika ein Kind an Malaria. Durch Malaria ist nicht nur die Gesundheit der Menschen in diesen Regionen betroffen, sondern diese Krankheit führt auch zu bedeutenden sozialen und wirtschaftlichen Lasten. Wirtschaftswissenschaftler schätzen, dass Malaria in einigen afrikanischen Ländern für eine Wachstums-Einbuße von bis zu 1,3% pro Jahr verantwortlich ist (<http://www.cdc.gov>; <http://www.rbm.who.int>, 2005; Sachs und Malaney, 2002).

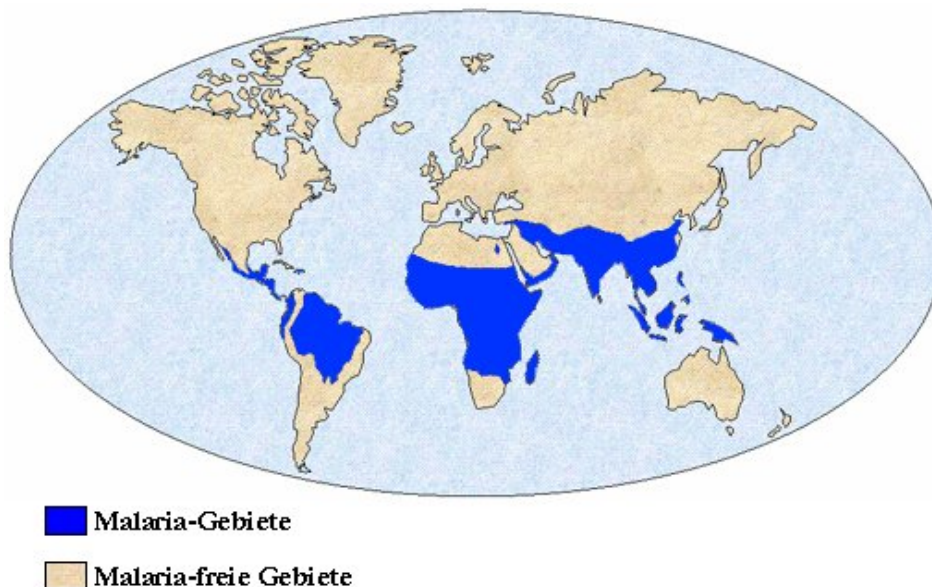


Abb.1.1: Geographische Verbreitung der Malaria.

(verändert nach <http://www.cdc.gov>, 2005)

Während Regionen in Afrika südlich der Sahara und Süd-Ost-Asien die meist betroffenen endemischen Gebieten darstellen, ist der Aspekt der importierten Malaria von wachsender

Bedeutung in Europa. Nach Angaben der WHO hat sich die Zahl importierter Fälle seit den frühen 70-er Jahren um das zehnfache erhöht.

Malaria wird durch einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen (Stamm Apicomplexa, Klasse *Haematozoa*, Ordnung *Coccidida*, Unterordnung *Haemosporididae*, Familie *Plasmodiidae*, Gattung *Plasmodium* (Lucius und Loos-Frank, 1997)). Die mehr als 100 *Plasmodium*-Arten, die in vier Untergattungen eingeteilt werden, können viele Tierarten wie z.B. Amphibien, Reptilien und Vögel und Säugetiere, hier aber nur Nager und Affen/Menschen, infizieren. Die vier humanpathogenen Arten sind *Plasmodium falciparum* (Erreger der Malaria tropica), *Plasmodium ovale* (Erreger der Malaria tertiana), *Plasmodium malariae* (Erreger der Malaria quartana) und *Plasmodium vivax* (Erreger der Malaria tertiana). Dabei entspricht die durch *P. falciparum* hervorgerufene Malaria tropica der gefährlichsten Form der Krankheit. *P. falciparum* ist weltweit in tropischen und subtropischen Regionen zu finden. Die meisten Malaria-Infektionen in Afrika (südlich der Sahara) werden durch *P. falciparum* hervorgerufen, der in dieser Region vorherrschenden und weltweit häufigsten *Plasmodium*-Art. *P. vivax* ist hauptsächlich in Asien, Lateinamerika und in einigen Teilen von Afrika zu finden und entspricht dem am weitesten verbreiteten humanen Malaria-Erreger. Die beiden anderen humanpathogenen *Plasmodium*-Arten sind weniger häufig anzutreffen, bzw. Infektionen mit *P. ovale* und *P. malariae* sind relativ selten. *P. malariae* ist in West- und Ost-Afrika sowie in Teilen Indiens verbreitet, wohingegen *P. ovale* größtenteils in Afrika, hier besonders West-Afrika, und auf Inseln im West-Pazifik zu finden ist. Erstmals beschrieben wurde der Erreger der Malaria 1880 von dem französischen Kolonialarzt Charles L. A. Laveran.

Neben den vier für Menschen pathogenen Erregern gibt es zahlreiche tierpathogene *Plasmodium*-Arten, wie z.B. die in Nagetieren Malaria hervorrufenden Arten *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* und *Plasmodium chabaudi*. Bei *Plasmodium gallinaceum* und *Plasmodium relictum* handelt es sich um Erreger der Vogel malaria.

In den letzten Jahren hat die Infektionskrankheit Malaria zu erhöhten Krankheits- und Sterblichkeitsziffern beigetragen (<http://www.rbm.who.int>, 2005). Das Problem diese Krankheit zu kontrollieren wird unter anderem durch mangelhafte Gesundheitsstrukturen in den betroffenen Ländern und den steigenden Resistenzen sowohl der Parasiten gegen herkömmliche Antimalaria-Medikamente als auch der Vektoren gegenüber Insektiziden erschwert. Unter den Antimalaria-Mitteln befinden sich unter anderen Chloroquin, Sulfadoxin-Pyrimethamin und Amodiaquin. Resistenzen gegen Chloroquin bei *P. falciparum* traten erstmals Ende der 50-er Jahre,

d.h. nicht lange nach der Einführung des Medikaments, an der Grenze zwischen Kambodscha und Thailand und in Kolumbien auf (Wellems und Plowe, 2001). Zwischen 1960 und 1970 breiteten sich die resistenten Parasiten auf Südamerika, Süd-Ost-Asien und Indien aus. Ende der 70-er Jahre wurden Resistenzen auch in Ost-Afrika entdeckt, die sich weiter ausbreiteten. Ende der 80-er Jahre wurden auch Chloroquin-Resistenzen in *P. vivax* nachgewiesen. Neuere Antimalaria-Mittel basieren auf Artemisinin bzw. auf Artemisinin-Derivaten; Resistenzen gegen diese Mittel sind noch nicht bekannt (<http://www.rbm.who.int>, 2005). Artemisinine sowie andere Antimalaria-Mittel werden in Kombinationstherapien eingesetzt, durch die die Bildung von Resistenzen verzögert werden soll. Allerdings sind Artemisinine in ihrer Wirkungsweise in holo-endemischen Gebieten noch relativ wenig untersucht. Diesbezüglich zeigte ein Vergleich verschiedener Kombinationstherapien, dass eine hohe Endemie von Malaria sich auf die Wirksamkeit der Artemisinin-basierenden Therapie auswirken könnte (Yeka *et al.*, 2005). Eine allumfassend wirksame Methode zur Kontrolle von Malaria gibt es nicht. Außerdem konnte bisher noch kein Antimalaria-Vakzin entwickelt werden, das vollständigen Schutz gewährleistet. Ansätze für die Entwicklung eines Antimalaria-Vakzins umfassen die Verwendung attenuierter Parasiten oder die Immunisierung mit stadienspezifischen Antigenen. Für letztere befinden sich einige Kandidaten in klinischen Studien in endemischen Gebieten. Darunter befindet sich RTS,S, ein auf einem prä-erythrozytärem Antigen basierendes Vakzin, durch das bei Kindern ein partieller Schutz gegenüber einer *P. falciparum*-Infektion erreicht werden konnte (Alonso *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2005). Im Hinblick auf attenuierte Parasiten konnten kürzlich durch genetisch abgeschwächte Parasiten Erfolge im Mausmodell erzielt werden (Mueller *et al.*, 2005), durch die, neben den durch Bestrahlung abgeschwächten Parasiten, ein neuer Ansatzpunkt für die Vakzin-Entwicklung eröffnet werden konnte (Waters *et al.*, 2005).

Strategien zur Verhinderung und Kontrolle von Malaria-Infektionen umfassen unter anderem den Kontakt zwischen Mensch und Überträger der Krankheit zu reduzieren. Ein Beitrag dazu liefert die Verwendung von Insektizid-behandelten Mosquito-Netzen, die die Infektion zwar nicht verhindert, allerdings deutlich reduziert (Nevill *et al.*, 1996; Guyatt *et al.*, 2002). Desweiteren ist die Bekämpfung der Vektoren, d.h. die Anzahl an Mücken in einem Gebiet zu reduzieren, zu nennen. Solche Ansätze umfassen die Reduktion von Brutstätten für Mücken, die gezielte Bekämpfung von Larven mit chemischen und biologischen Mitteln und das Sprühen von Insektiziden gegen adulte Mücken.

### 1.1.1 Pathologie der Malaria

Alle mit Malaria assoziierten, typischen klinischen Symptome und schwerwiegende Krankheitsverläufe werden durch den in Erythrozyten stattfindenden asexuellen Zyklus verursacht. Die Sporozoiten-, Leber- und Gametozyten-Stadien (siehe 1.1.2) sind asymptomatisch. Malaria ist eine Krankheit, die verschiedene Gewebe und Organe betrifft. Von den vier humanpathogenen *Plasmodium*-Arten ist die auf einer Infektion mit *P. falciparum* basierende Malaria-Erkrankung die häufigste Ursache von Morbidität und Mortalität (<http://www.cdc.gov>).

Die akute Erkrankung ist gekennzeichnet durch Fieber, verbunden mit Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Erbrechen, Muskelschmerzen, Abgeschlagenheit, Schweißausbrüchen und Schwindel. Je nach *Plasmodium*-Art erfolgen die Fieberanfälle in Schüben, die auf der synchronen Vermehrung der Parasiten bzw. dem synchronen Zugrundegehen von Erythrozyten basieren. Bei *P. vivax* und *P. ovale* passiert dies in einem Abstand von 48 Stunden (Malaria tertiana) bzw. bei *P. malariae* von 72 Stunden (Malaria quartana). Die Fieberanfälle bei einer *P. falciparum*-Infektion sind aufgrund der asynchronen Vermehrung des Parasiten nicht regelmäßig (Malaria tropica) (Lucius und Loos-Frank, 1997). Bei Mischinfektionen mit verschiedenen *Plasmodium*-Arten sind diese unregelmäßigen Fieberschübe auch zu finden.

Durch die mit der Vermehrung der Parasiten einhergehende Zerstörung der Erythrozyten werden toxische Faktoren, wie z.B. das akkumulierte Hämozoïn, in das Blut abgegeben. Dadurch werden u.a. Makrophagen stimuliert, Cytokine (TNF- $\alpha$ ) und andere lösliche Faktoren auszuschütten, die für das Auslösen von Fieber verantwortlich sind.

Für die schwerwiegend verlaufende Form der Malaria-Infektion durch *P. falciparum* sind verschiedene Faktoren verantwortlich, darunter auch Cytokine (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) und Stickstoffoxid (NO). Allerdings spielen einige dieser Faktoren insofern eine Doppelrolle, als das sie zugleich an der Abtötung der Parasiten und an der Pathogenese der Krankheit beteiligt sind. Die klinischen Symptome der schwerwiegend verlaufenden Malaria-Infektion sind z.B. eine durch den Stoffwechsel des Parasiten auftretende Azidose, eine schwerwiegende Anämie oder zerebrale Malaria (Miller *et al.*, 2002). Die Azidose tritt unter anderem durch die erhöhte Bildung von Milchsäure durch den Parasiten und deren unzureichende Entfernung durch die Leber auf. Faktoren, die zur Anämie führen, sind z.B. die Hämolyse und Phagozytose der infizierten Erythrozyten und die reduzierte Erythropoese.

Mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten können an das Endothelium von Blutgefäßwänden binden, ein Vorgang der als Zytoadhäsion bezeichnet wird. Hierzu sind mit Trophozoiten und Schizonten-infizierte Erythrozyten fähig. Diese Sequestrierung der Parasiten ist in verschiedenen

Organen wie Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Niere, subkutanem Gewebe und Plazenta zu finden (Miller *et al.*, 2002). Der Parasit ermöglicht diese Adhäsion der Erythrozyten an die Endothelzellen durch Veränderung der Erythrozytenoberfläche durch die Expression des *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) (Baruch *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1995). Durch dieses Protein ist der infizierte Erythrozyt fähig, mit den Rezeptoren auf den Blutgefäß-Endothelzellen der verschiedenen Organe, wie z.B. CD36, Chondroitin-4-Sulfat (CSA) und ICAM-1, zu interagieren (Craig und Scherf, 2001; Miller *et al.*, 2002). Die Zytoadhäsion verhindert die Eliminierung der infizierten Erythrozyten in der Milz, die infizierte bzw. veränderte Erythrozyten erkennt und aus der Zirkulation entfernt. Durch PfEMP1 besitzen infizierte Erythrozyten außerdem die Fähigkeit, an nicht-infizierte Erythrozyten (*rosetting*) zu adhären (Wahlgren *et al.*, 1992). Sowohl die Bindung der infizierten Erythrozyten an Endothelzellen als auch an nicht-infizierte Erythrozyten führt zu einer veränderten Zirkulation des Blutes. Dadurch kommt es zu einer lokalen Unterversorgung der betreffenden Organe mit Sauerstoff, was letzten Endes zu Schädigungen dieser Organe führt.

Die Zytoadhäsion ist sowohl die Grundlage der zerebralen Malaria (Turner *et al.*, 1994), bei der die Sequestrierung im Gehirn stattfindet, als auch der maternalen Malaria, mit Sequestrierung in der Plazenta von Frauen während der ersten Schwangerschaft (Andrews und Lanzer, 2002). Bei der maternalen Malaria kann es zu einem vermindertem Geburtsgewicht, Früh- oder Totgeburten sowie Aborten kommen. Außerdem besteht die Gefahr einer schweren Anämie der Mutter. Die zerebrale Malaria kann zu Seh-, Koordinations- und Bewusstseinsstörungen bis hin zu Koma und Tod führen.

Allerdings ist die Bindung von infizierten Erythrozyten an Endothelzellen nicht immer mit einem schwerwiegenden Verlauf der Krankheit verbunden. Die Faktoren, die den Übergang einer unkomplizierten zu einer schwerwiegenden Infektion verursachen, sind noch unklar (Miller *et al.*, 2002).

### 1.1.2 Der *Plasmodium*-Lebenszyklus

Ein Kennzeichen des *Plasmodium*-Lebenszyklus ist die Abfolge von Invasions- und Replikationsstadien im Wirbeltier und in der Stechmücke. Bei diesem obligat intrazellulären Einzeller ist der Generationswechsel mit einem Wirtswechsel zwischen Wirbeltier und *Anopheles*-Mücke (Stamm *Arthropoda*, Unterstamm *Tracheata*, Klasse *Insecta*, Unterklasse *Pterygota*, Ordnung *Diptera*, Unterordnung *Nematocera*, Familie *Culicidae*, Gattung *Anopheles*; (Storch und Welsch, 2004)) verknüpft. Dabei wechseln sich mehrere asexuelle Generationen mit einer sexuellen Generation ab. Die geschlechtliche Vermehrung beginnt im Wirbeltier und wird im Insekt vollendet

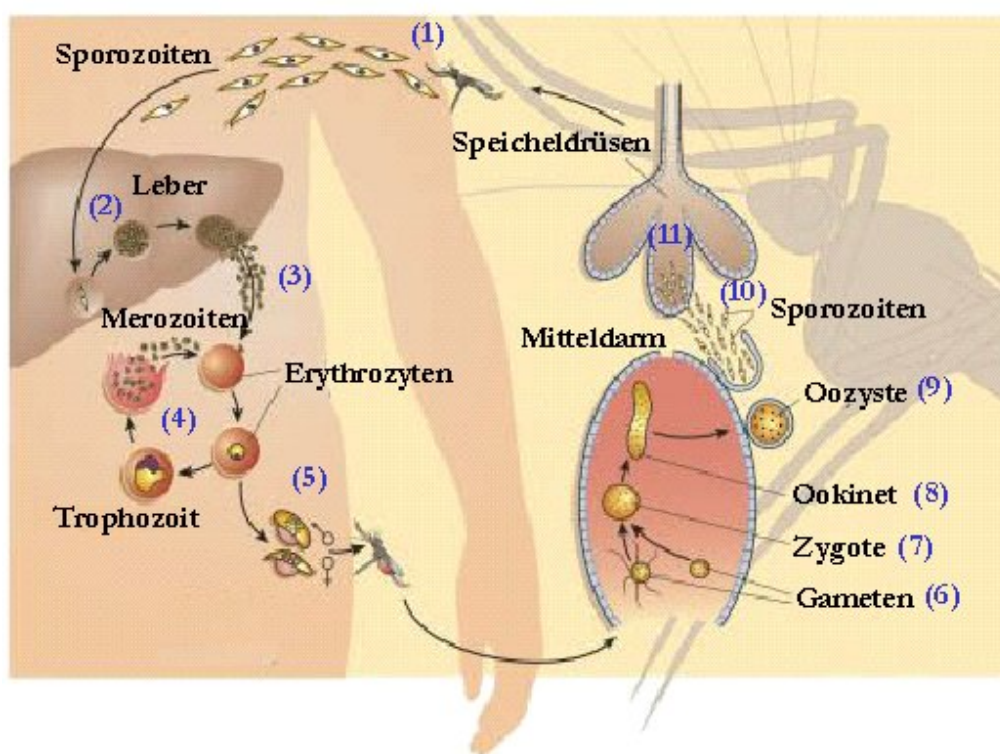
(Gamogonie). Auf die anschließende ungeschlechtliche Vermehrung (Sporogonie), die ausschließlich in der (weiblichen) Mücke stattfindet, folgt eine weitere asexuelle Phase (Schizogonie), die im Wirbeltier vollzogen wird.

Nagetierpathogene *Plasmodium*-Arten sind praktische Modelle für experimentelle Studien der Säugetier-Malaria. Diese Parasiten erwiesen sich in den wichtigsten Aspekten der Morphologie, der Physiologie und des Lebenszyklus als analog zu den Malaria-Erregern des Menschen und anderen Primaten. Deshalb stellen sie wertvolle Modelle für die Untersuchung verschiedener Fragestellungen wie z. B. die Entwicklung der Malaria-Parasiten, die Interaktion zwischen Parasit und Wirt, die Entwicklung von Vakzinen und die Wirkungsweise von neuen Medikamenten dar. In der Forschung wird häufig *Plasmodium berghei* als Modellorganismus verwendet, der 1948 von Vincke und Lips entdeckt wurde. Der natürliche Wirt von *P. berghei* ist die Galeriewaldratte *Grammomys surdaster*, sowie *Praomys jacksoni* und *Leggada bella*, die in Zentralafrika vorkommen. Als natürlicher Vektor für die Übertragung von *Plasmodium berghei* ist *Anopheles durenii millescampsi* beschrieben, im Labor-Modell wird jedoch *Anopheles stephensi* verwendet.

Durch den Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke werden *Plasmodium*-Sporozoiten auf den Wirbeltier-Wirt übertragen (Abbildung 1.2(1)). Dabei werden die Parasiten in das subkutane Gewebe oder, seltener, direkt in den Blutstrom injiziert. Mit dem Blutstrom gelangen die Sporozoiten schnell zur Leber und invadieren dort über das Endothel die Hepatozyten (Frevort, 2004) (2). In der Leber entwickeln sich die Sporozoiten durch asexuelle Vermehrung zu exo-erythrozytären Schizonten. Abhängig von der *Plasmodium*-Art dauert diese exo-erythrozytäre Schizogonie 2-15 Tage. Im Vergleich zu *P.berghei* (47-52 Stunden) liegt die Dauer der exo-erythrozytären Vermehrung bei den humanpathogenen Arten zwischen 6 und 15 Tagen. Die Invasion der Leberzellen wird dabei durch die aktive Bewegung des Parasiten und eine Einstülpung der Wirtsplasmamembran vermittelt, wodurch eine parasitophore Vakuole gebildet wird, die den eindringenden Sporozoiten umgibt. Über das Trophozoiten-Stadium entwickelt sich der Sporozoit zum Leberstadien-Schizonten, der tausende Merozoiten enthält. Die Anzahl an Merozoiten pro Leberschizont kann dabei zwischen den einzelnen *Plasmodium*-Arten und in den verschiedenen Wirten variieren.

Für *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium cynomolgi* sind ruhende Stadien in der Leber, sogenannte Hypnozoiten, bekannt (Krotoski *et al.*, 1982). Diese können Wochen bis Jahre in der Leber persistieren bevor sie die exo-erythrozytäre Schizogonie vollziehen, wodurch es zu Rückfällen der Malaria-Infektion kommt. In *P. berghei* ist das Auftreten solcher Stadien nicht

bekannt. Allerdings konnten, sich langsam entwickelnde (chronische) Leberschizonten im natürlichen Wirt der Nagetier-Parasiten beschrieben werden (Landau und Chabaud, 1994). Durch Aufplatzen der Leberzelle gelangen die haploiden Merozoiten des Leberschizonten in den Blutstrom und sind dort fähig, Erythrozyten zu invadieren (3). *P. berghei* (sowie *P. yoelii*) bevorzugt im Vergleich zu *P. falciparum* die Invasion von Retikulozyten, wobei auch reife Erythrozyten befallen werden können. Die Merozoiten entwickeln sich in den roten Blutkörperchen innerhalb einer parasitophoren Vakuole (Lingelbach und Joiner, 1998) über das Ring- und Trophozoiten-Stadium zu reifen Schizonten (erythrozytäre Schizogonie; (4)). Malaria-Parasiten verwenden das Hämoglobin der roten Blutkörperchen als Quelle für Aminosäuren. Allerdings können sie das anfallende Nebenprodukt Häm nicht abbauen. Freiliegendes Häm ist toxisch für die Parasiten, weshalb es zu dem unlöslichen Hämozoïn (Malaria-Pigment) polymerisiert und in der Nahrungsvakuole akkumuliert wird (Goldberg und Slater, 1992).



**Abb.1.2: Lebenszyklus von Plasmodium.** Erklärungen zu den einzelnen Schritten im Text (modifiziert nach Wirth, 2002).

Durch Aufplatzen der Erythrozyten, die die segmentierten Schizonten enthalten, werden die neu gebildeten Merozoiten entlassen, die in weitere rote Blutkörperchen eindringen können. Auch die Dauer der erythrozytären Schizogonie ist unterschiedlich zwischen den einzelnen *Plasmodium*-Arten. So dauert diese Entwicklung bei *P. berghei* zirka 22-24 Stunden und bei *P. falciparum* zirka



48 Stunden. Da die Blutstadien-Entwicklung bei *P. berghei* relativ asynchron verläuft, sind alle Stadien (Ringe, Trophozoiten und Schizonten) dieser ungeschlechtlichen Vermehrung zeitgleich im Blut vorhanden.

Während jedem Zyklus der erythrozytären Schizogonie differenzieren sich einige Parasiten zu sexuellen Stadien, sogenannten Gametozyten (5). Diese haploiden, sogenannten Makrogametozyten (weiblich) und Mikrogametozyten (männlich) sind die Vorstufen der weiblichen und männlichen Gameten. Über die molekularen Mechanismen, die für den Wechsel und die Regulation zwischen der ungeschlechtlichen Vermehrung und sexuellen Differenzierung verantwortlich sind, ist wenig bekannt. Allerdings gibt es sowohl für *P. falciparum* als auch für *P. berghei* Hinweise, dass Umweltfaktoren den Umschaltmechanismus beeinflussen (Dyer und Day, 2000). Der Unterschied in der Entwicklungsdauer der Gametozyten zwischen *P. falciparum* und *P. berghei* ist enorm; der schnellen Differenzierung von 26-30 Stunden bei *P. berghei* steht eine 8-11 Tage dauernde Entwicklung bei dem humanpathogenen Erreger gegenüber. Außerdem unterscheiden sich die Gametozyten der beiden *Plasmodium*-Arten morphologisch; die Gametozyten von *P. falciparum* sind kapsel-förmig, wohingegen die Gametozyten von *P. berghei* eine eher runde Morphologie besitzen.

Ausschließlich die reifen Gametozyten, die von der *Anopheles*-Mücke aufgenommen wurden, entwickeln sich im Darm der Mücke zu Gameten (Gametogenese; (6)). Dabei entwickelt sich der weibliche Gametozyt zu einem kugelförmigen Makrogameten, wohingegen der männliche Gametozyt, durch den Prozess der Exflagellation, acht begeißelte Mikrogameten bildet. Die Exflagellation ist ein sehr schneller Vorgang, der innerhalb von 10-20 Minuten nach der Aufnahme der Gametozyten in den Mückendarm abgeschlossen ist. Induziert wird die Exflagellation durch den Wirtswechsel und den damit veränderten Milieubedingungen. Von Bedeutung für die Exflagellation scheinen dabei der Temperaturabfall (von bis zu 5°C), der pH-Anstieg (von 7,3 auf 7,8-8,0) und die Anwesenheit des Gametozyten-Aktivierungs-Faktors Xanthurensäure (Sinden und Croll, 1975; Billker *et al.*, 1998) zu sein. Die Fusion der haploiden Gameten führt zu einer nicht-beweglichen diploiden Zygote (7), die sich in einen beweglichen Ookineten (8) differenziert. Die Entwicklung der diploiden Zygote zum Ookineten ist in einer Zeitspanne von 18-24 Stunden abgeschlossen. Unterschiede im Prozess der Gametenbildung, der Morphologie der Gameten sowie der Morphologie der Ookineten zwischen humanen und Nagetier-Malaria-Erregern sind kaum zu finden. Der Ookinet durchquert das Mitteldarm-Epithelium, setzt sich im extrazellulären Raum zwischen Epithelium und Basallamina fest und differenziert dort zur Oozyste (9) (Han *et al.*, 2000; Sinden und Billingsley, 2001). Durch asexuelle, mitotische Teilung bildet sich die reife Oozyste, die Tausende an Tochterzellen

(Sporozoiten) beinhaltet. Diese Mitteldarm-Sporozoiten werden in das Hämozoel der Mücke freigesetzt und gelangen so zur Speicheldrüse (10). Sporozoiten wandern durch die Azinar-Zellen der Drüse und gelangen in den extrazellulären sekretorischen Raum, wo sie mehrere Wochen persistieren können (11). Bei der nächsten Blutmahlzeit können die Sporozoiten mit dem Speichel auf einen neuen Wirt übertragen werden.

### 1.1.3 Der *Plasmodium*-Vektor: *Anopheles*-Mücken

Ronald Ross beschrieb die Übertragung von *Plasmodium* (1897) durch *Anopheles*-Mücken. Von den zirka 430 *Anopheles*-Arten sind (in der Natur) 30-40 kompetente Vektoren für die Übertragung von Malaria. Bis auf die Antarktis sind *Anopheles*-Mücken weltweit verbreitet und somit gibt es auch in nicht malaria-endemischen Gebieten Mücken dieser Gattung, die *Plasmodium* übertragen können. Welche *Anopheles*-Spezies in welchem Gebiet die Krankheit überträgt, hängt von den in der jeweiligen Region herrschenden Umweltbedingungen ab.

Wie alle Mücken passieren auch anopheline Mücken vier Stadien während ihres Lebenszyklus; das Ei-, Larven-, Puppen- und Adult-Stadium. Adulte Weibchen legen zwei bis drei Tage (abhängig vom Klima) nach der Blutmahlzeit 50-200 Eier. Da die Eier nicht resistent gegen Austrocknung sind, werden sie auf Wasser gelegt. In Abhängigkeit vom Klima schlüpfen die Eier in warmen Regionen nach 2-3 Tagen. Die Larven durchlaufen eine in vier Stadien ablaufende Entwicklung bevor sie sich verpuppen. Die Habitate von Larven sind weit verbreitet; so finden sich Larven von *Anopheles*-Mücken im Marschland, Mangrovensümpfen, Reisfeldern, grasbewachsenen Gräben, an Rändern von Bächen und Flüssen und kleinen temporären Regenpfützen.

Die Zeitspanne der Entwicklung vom Ei bis zur adulten Mücke variiert unter den verschiedenen Arten und wird sehr durch die umgebende Temperatur beeinflusst. Unter tropischen Bedingungen beträgt diese Zeitspanne typischerweise 10-14 Tage.

Die adulten Stadien zeigen einen sexuellen Dimorphismus. Männliche und weibliche adulte Mücken unterscheiden sich deutlich in der Größe, wobei die Männchen kleiner sind. Desweiteren besitzen die Weibchen stechend-saugende Mundwerkzeuge im Vergleich zu leckend-saugenden bei den Männchen. Auffällig bei den Männchen sind auch die gefederten Antennen.

Die männlichen adulten Mücken leben zirka eine Woche und ernähren sich hauptsächlich von Pflanzensäften. Auch die Weibchen benötigen Zuckerquellen für die Energiegewinnung und eine Blutmahlzeit (Proteinquelle) für die Ei-Produktion. Nach der Eiablage fährt die weibliche Mücke damit fort, einen weiteren Wirt zu suchen, d.h. der Zyklus wiederholt sich bis das Weibchen

stirbt. Dabei kann eine weibliche adulte *Anopheles*-Mücke bis zu zwei Monaten leben, allerdings ist die Lebensdauer in der Natur wahrscheinlich nicht länger als 2-3 Wochen.

Ein epidemiologisch wichtiges Verhaltensmerkmal ist, ob die *Anopheles*-Arten Menschen (anthropophil) oder Tiere (zoophil) oder beide als Blutquelle bevorzugen.

Das Stechverhalten der Mücken ist abhängig von Lockstoffen der potentiellen „Blutspender“, wie CO<sub>2</sub> und Isovaleriansäure und physischen Faktoren, wie Wärme und Feuchtigkeit. Außerdem zeigen unterschiedliche Arten ein tageszeitliches Stechverhalten, d.h. viele *Anopheles*-Mücken sind aktiv während der Abend- oder Morgendämmerung oder aber nacht-aktiv. Während des Stechens zeigen die Mücken ein stereotypisches Penetrations-Verhalten, in dem *probing*, Aufnahme von Blut und Zurückziehen des Stechrüssels nacheinander ablaufen (<http://www.cdc.gov>; Baty und Marquardt, 1996).

### 1.2 Invasion von *Apicomplexa*

Intrazelluläre Pathogene benutzen verschiedene Strategien um Wirtszellen zu invadieren und zelluläre Signalwege zu modulieren und so der Wirtsabwehr zu entgehen. In der Regel nutzen Pathogene wie Viren, Bakterien, aber auch *Trypanosoma cruzi* und Leishmanien, durch den Wirt vermittelte Prozesse wie Phagozytose oder Endozytose, um in die Zielzelle zu gelangen. Im deutlichen Gegensatz dazu, ist die Invasion von Parasiten des Phylums *Apicomplexa* ein aktiver, Wirtszell-unabhängiger Prozess (Sibley, 2004). Alle invasiven Parasiten-Stadien dieses Phylums sind stark polarisierte Zellen, die einzigartige sekretorische Vesikel enthalten, die nur in *Apicomplexa* zu finden sind. Diese Organellen, Mikronemen, Rhoptrien und *dense granules*, enthalten Proteine, die zunächst für die Bewegung und die Invasion der Parasiten und anschließend für die Modellierung der parasitophoren Vakuole wichtig sind. Zusammen mit dem polaren Ring, der eines der MTOCs (*microtubule-organizing centers*) darstellt, bilden die Mikronemen und Rhoptrien den apikalen Komplex am anterioren Pol, der namensgebend für das Phylum ist. Die Zellhülle (Pellikula) der Parasiten besteht aus der Plasmamembran und zwei eng nebeneinander liegenden inneren Membranen, dem sogenannten *inner membrane complex* (IMC). Die feste Form und Beweglichkeit der Zellen wird durch Mikrotubuli aufrechterhalten, die subpellikular in Reihen die Zelle durchziehen (Morrissette und Sibley, 2002).

#### 1.2.1 Gleitbewegung und Invasion

Bei der Gleitbewegung (*gliding motility*) handelt es sich um eine besondere Form der Fortbewegung. Trotz des Fehlens von Flagellen oder Geißeln können sich die Parasiten auf Substrat fortbewegen. Diese Substrat-abhängige Form der Bewegung verläuft dabei ohne

Veränderung der Zellgestalt (Vanderberg, 1974) und ist nur in *Apicomplexa* zu finden. In *Plasmodium* zeigen Sporozoiten aus dem Mitteldarm eine im Vergleich zu Speicheldrüsen-Sporozoiten sehr reduzierte *gliding motility* (Vanderberg, 1974). *In vitro* zeigen Speicheldrüsen-Sporozoiten eine zirkuläre Form der Bewegung (Vanderberg, 1974; Stewart und Vanderberg, 1988); auch die Bewegung von Ookineten kann *in vitro* beobachtet werden (Dessens *et al.*, 1999). Für das dritte invasive *Plasmodium*-Stadium, den Merozoiten, konnte bisher keine Bewegung *in vitro* gezeigt werden.

Der Invasionsprozess erfordert die spezifische Bindung der Parasiten an die Wirtszellen (Adhäsion) und das aktive Eindringen der Parasiten. *Plasmodium*-Parasiten können Zellen auf zwei Wegen penetrieren. Ookineten und Sporozoiten müssen mehrere biologische Barrieren, unter anderem die peritrophe Membran und das Mitteldarm-Epithelium bzw. die Speicheldrüsen und vaskuläre Endothelzellen, durchdringen. *Plasmodium* penetriert diese Zellen, wie alle *Apicomplexa*, aktiv durch Transmigration unter transients Perforation der jeweiligen Plasmamembran (*breaching*) (Mota *et al.*, 2001). Sobald der Parasit eine Zielzelle, ein geeigneter Hepatozyt bei Sporozoiten und ein Erythrozyt bei Merozoiten, identifiziert, dringt der Parasit mit einem neuen Mechanismus, durch Invagination der Plasmamembran und Ausbildung eines neuen Kompartiments, der parasitophoren Vakuole, ein.

Transmigration und Invasion erfordern verschiedene Komponenten des Parasiten. Unter anderem einen molekularen Motor, der die Bewegung erzeugt, sowie Adhäsionsproteine und Proteine, die die verschiedenen Komponenten des Motorkomplexes verbinden.

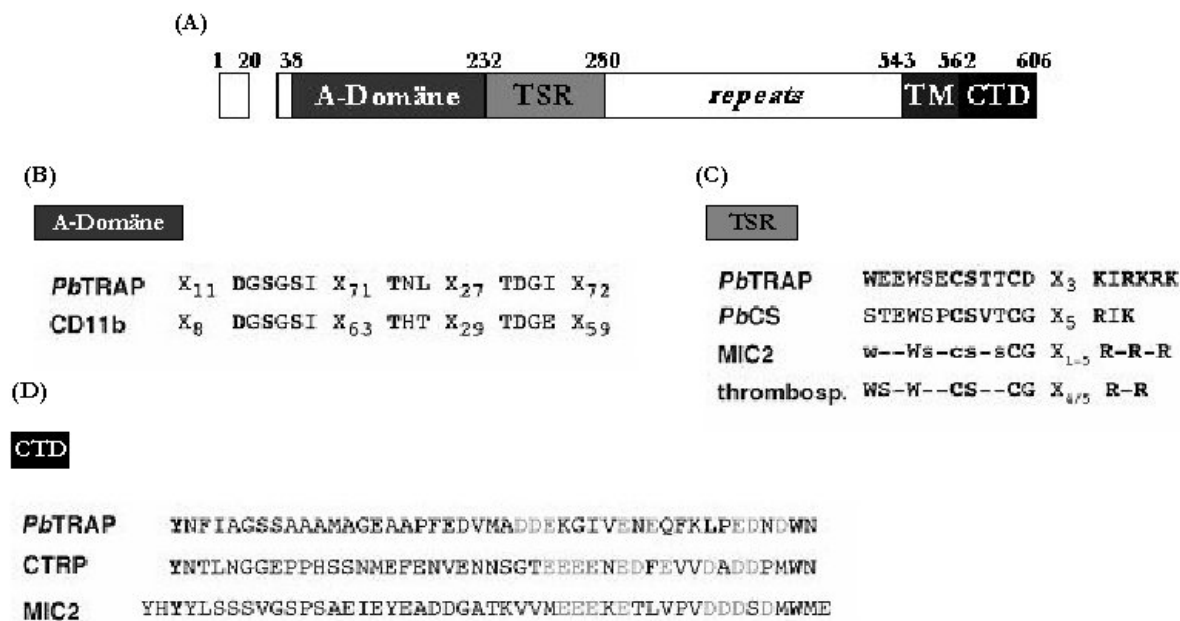
### 1.2.2 Die TRAP-Proteinfamilie

TRAP (Robson *et al.*, 1988) ist das Gründungsmitglied einer *Apicomplexa*-Proteinfamilie, die die Gleitbewegung und Invasion der Parasiten vermitteln (Sultan *et al.*, 1997). Alle Mitglieder dieser Familie sind TypI- Transmembranproteine, die extrazellulär zwei adhäsive Domänen enthalten, die je nach Protein, in unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen. Dabei handelt es sich um die von Willebrand Faktor A-Domäne (Girma *et al.*, 1987; Whittaker und Hynes, 2002) bzw. den TSR (*thrombospondin typeI repeat*) (Lawler und Hynes, 1986; Tucker, 2004). Ein weiteres charakteristisches Merkmal dieser Proteinfamilie ist eine kurze zytoplasmatische Domäne, die durch eine Ansammlung negativ geladener Aminosäuren und einem Carboxy-terminal konservierten Tryptophan-Rest gekennzeichnet ist. Durch genetische Studien konnte gezeigt werden, dass in *Plasmodium*-Sporozoiten das TRAP-Protein (*thrombospondin-related anonymous protein*) sowohl für die Gleitbewegung (*gliding motility*) als auch für die Infektion der Speicheldrüsen im Moskito-Vektor und für die Infektion der Hepatozyten im Säugetier-Wirt essentiell ist (Sultan *et*

*al.*, 1997). Weitere Mitglieder der TRAP-Familie sind z.B. MIC2 von *Toxoplasma gondii* (Wan *et al.*, 1997), Etp100 von *Eimeria* (Tomley *et al.*, 1991) und BbTRAP von *Babesia* (Gaffar *et al.*, 2004a). In *Plasmodium* wird zusätzlich zu TRAP ein weiteres Mitglied dieser Familie, das *Circumsporozoite- and TRAP-related protein* (CTRP), in Ookineten exprimiert (Trottein *et al.*, 1995). CTRP konnte als das Invasin von Ookineten identifiziert werden (Dessens *et al.*, 1999; Templeton *et al.*, 2000). Genetische Studien zeigten, dass das Protein essentiell für das Eindringen von Ookineten in das Mitteldarm-Epithelium im Mosquito und somit für die Bildung von Oozysten ist.

Eine schematische Darstellung der Proteinstruktur von *Plasmodium berghei* TRAP ist in Abbildung 1.3 gezeigt, wobei die einzelnen charakteristischen Domänen hervorgehoben werden. Im Vergleich zu TRAP, das jeweils nur eine A-Domäne bzw. TSR besitzt, sind in der extrazellulären Domäne von CTRP 6 A-domänen und 7 TSRs zu finden (Yuda *et al.*, 1999). A-Domänen umfassen zirka 200 Aminosäuren und sind in vielen Adhäsionsproteinen, wie z.B. Integrin  $\alpha$ -Ketten und zahlreichen Matrixproteinen, enthalten. Diese Domänen besitzen ein konserviertes Motiv, das als MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) bezeichnet wird und die Liganden-Bindung vermittelt (Michishita *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995). Das MIDAS-Motiv wird durch 5 invariante Aminosäure-Reste gebildet, durch die ein divalentes Kation (Magnesium oder Mangan) koordiniert wird, und umfasst das Sequenz-Motiv DXSXS, ein konserviertes Threonin und ein Carboxy-terminales Aspartat (Abbildung 1.3(B)). Diese Aminosäure-Reste sind in der A-Domäne von TRAP aller *Plasmodium*-Arten konserviert (Templeton und Kaslow, 1997). Auch TSR-Domänen sind in einer Vielzahl verschiedener Proteine zu finden, darunter Proteine des Komplementsystems, Adhäsionsproteine und Proteine, die an der Angiogenese beteiligt sind. Die TSRs sind zirka 60 Aminosäuren lange Domänen, die zwei konservierte Motivabschnitte enthalten: ein N-terminales WSxW-Tetrapeptid und eine C-terminale Ansammlung basischer Aminosäuren, die durch ein zentrales Motiv mit zwei Cystein-Resten von dem Tetrapeptid getrennt werden (Abbildung 1.3(C)). Das Tetrapeptid ist an der Bindung von Heparin bzw. die basischen Aminosäuren an der Bindung von sulfatierten Glykokonjugaten beteiligt (Guo *et al.* 1992; Sinnis *et al.*, 1994; Robson *et al.*, 1995).

Im TRAP-Protein werden die Adhäsionsdomänen durch eine sogenannte *repeat*-Region von der Transmembrandomäne getrennt (Abbildung 1.3). Hierbei handelt es sich um eine wiederholte Abfolge einer Tri-Peptidsequenz, die immer mit Prolin beginnt.



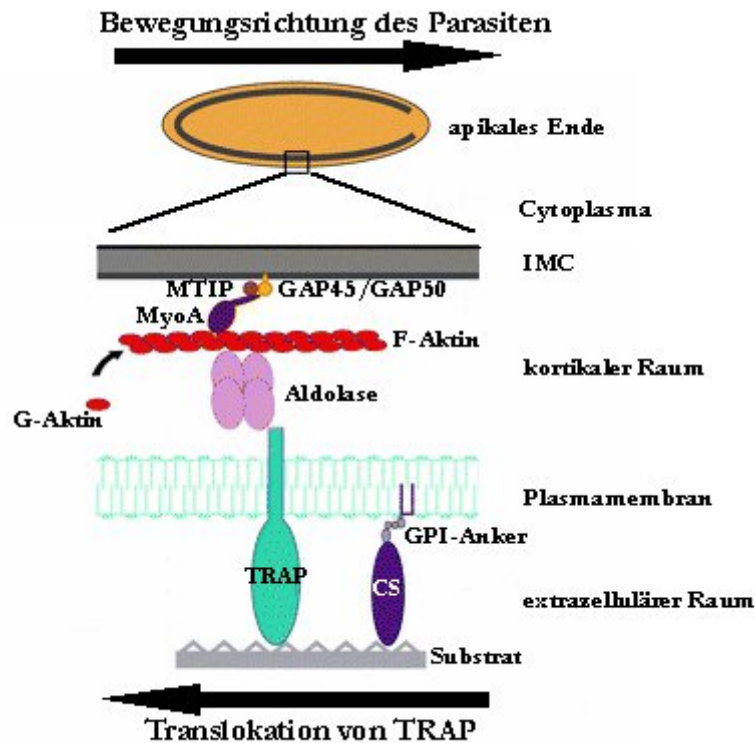
**Abb.1.3: Schematische Proteinstruktur des *Plasmodium berghei* TRAP-Proteins.** (A) Gezeigt sind die extrazellulären Domänen, die von Willebrand A-Domäne und der TSR (*thrombospondin type I repeat*). Die beiden adhäsiven Domänen werden durch eine *repeat*-Region (Tri-Peptid-Wiederholungen mit Prolin als Startaminosäure) von der Transmembrandomäne getrennt, auf die eine kurze zytoplasmatische Region folgt (CTD). (B) Sequenzvergleich der in der A-Domäne vorhandenen MIDAS-Motive der Proteine *Pb* TRAP und dem Integrin CD11b. Die fünf an der Koordination beteiligten Aminosäure-Reste sind in schwarz hervorgehoben. (C) Sequenzvergleich der die TSR-Domäne definierenden Motive der Proteine *Pb* TRAP, *Pb* CS (*circumsporozoite protein*), *Tg* MIC2 (*T. gondii micronemal protein 2*) und humanes Thrombospondin. Sowohl konservierte Tryptophan-Reste als auch die C-terminale Anhäufung basischer Aminosäuren, die durch zwei Cystein-Reste voneinander getrennt werden, sind schwarz hervorgehoben. (D) Aminosäurenvergleich der zytoplasmatischen Domänen (CTD) der TRAP-Familien-Mitglieder *Pb* TRAP, *Pf* CTRP und *Tg* MIC2. Sowohl das N-terminal konservierte Tyrosin als auch das C-terminale Tryptophan sind in schwarz hervorgehoben; negative geladene Aminosäuren sind grau gezeigt. Abkürzungen: TM (Transmembrandomäne), CTD (*cytoplasmic tail domain*).

Die Primärstrukturen der für Mitglieder der TRAP-Proteinfamilie charakteristischen zytoplasmatischen Domänen enthalten lediglich das N-terminale Sequenzmotiv Yxx $\phi$ , eine Ansammlung negativer Aminosäuren und das Tryptophan nahe dem C-terminus, und zeigen darüber hinaus keine Sequenz-Homologien (Abbildung 1.3(D)). Das Yxx $\phi$ -Motiv, wobei  $\phi$  einer hydrophoben Aminosäure entspricht, ist in zahlreichen eukaryotischen Proteinen zu finden, wo es in das *Sorting* von Proteinen in bestimmte sub-zelluläre Kompartimente (Endosomen, Lysosomen) und an die Plasmamembran involviert ist (Bonifacino und Dell'Angelica, 1999). Für TRAP konnte gezeigt werden, dass dieses Tyrosin-basierende Motiv für die Lokalisation des

Proteins in den Mikronemen und an der Plasmamembran eine Rolle spielt (Bhanot *et al.*, 2003). Desweiteren spielt die zytoplasmatische Domäne von TRAP eine wichtige Rolle bei der Bewegung und Invasion der Parasiten. Eine Deletion eines großen Teils der Domäne führte zu nicht-invasiven und nicht-motilen Parasiten (Kappe *et al.*, 1999). Durch Mutationen sowohl des Tryptophans als auch der benachbarten negativen Resten konnten die an der Ausführung dieser Funktionen essentiellen Aminosäuren identifiziert werden (Kappe *et al.*, 1999). Die Komplementation dieser Region von TRAP durch die zytoplasmatische Domäne von *Tg* MIC2 zeigte erstmals, dass die molekularen Mechanismen der Gleitbewegung und Invasion verschiedener *Apicomplexa* konserviert sind und MIC2 das funktionelle TRAP-Orthologe in *T. gondii*-Tachyzoiten ist.

### 1.2.3 Die Motormaschinerie

Die *gliding motility* und die aktive Invasion von Wirtszellen werden beide durch einen Aktin-Myosin-Motor vermittelt (Ménard, 2001; Sibley, 2004), der zwischen der Plasmamembran und dem IMC (*inner membrane complex*) lokalisiert ist. Beide Prozesse sind abhängig von Aktinfilamenten des Parasiten (Dobrowolski und Sibley, 1996). Das beteiligte MyosinA (MyoA) gehört einer Klasse von unkonventionellen Myosinen (Klasse XIV) an, die nur in *Apicomplexa* vorkommen (Heintzelman und Schwartzman, 1997; Meissner *et al.*, 2002). Diese Myosin-Klasse unterscheidet sich von anderen Myosinen z.B. durch ungewöhnlich kurze *neck*- und *tail*-Domänen und dadurch, dass diese Klasse auch nicht die konservierten Sequenz-Motive besitzt, an die in anderen unkonventionellen Myosinen die leichten Ketten binden. Im derzeitigen Modell der Motormaschinerie (Abbildung 1.4) (Kappe *et al.*, 2004b), das im folgenden am Beispiel von Sporozoiten erklärt werden soll, wird MyoA durch weitere Proteine an die äußere Membran des *inner membrane complex* (IMC) gebunden. Dabei interagiert eines der Proteine, MTIP (*MyoA tail domain interacting protein*), mit der *tail*-Domäne von MyoA (Bergman *et al.*, 2003). Da MTIP aber keine Transmembrandomäne oder potentiellen Lipid-Anker besitzt, ist ein weiteres Protein notwendig, das den MyoA/MTIP-Komplex am IMC verankert. In *Toxoplasma gondii* konnten zwei weitere Komponenten des Motorkomplexes identifiziert werden, die als GAP45 (*gliding-associated protein*) und GAP50 bezeichnet wurden (Gaskins *et al.*, 2004). GAP50 ist ein integrales Membranprotein das am IMC lokalisiert ist und GAP45 ist (*in vivo*) myristyliert.



**Abb.1.4: Modell zum Aufbau der Motor-Maschinerie in Apicomplexa.** Gezeigt sind ein *Plasmodium* Sporozoit und die Vergrößerung der Motor-Maschinerie, mit den derzeit bekannten und hypothetischen Proteinkomponenten. Der Motor ist zwischen Plasmamembran und IMC des Parasiten lokalisiert. MTIP ist hier durch die potentiellen Interaktionspartner GAP45 und GAP50 mit der äußeren Membran des IMCs verankert. Die *tail*-Domäne von MyoA interagiert mit MTIP, wohingegen die *head*-Domäne von MyoA an filamentöses Aktin (F-Aktin) bindet. F-Aktin wird durch Aldolase mit der zyttoplasmatischen Domäne von TRAP verbunden. Abkürzungen: IMC (*inner membrane complex*); MTIP (*MyoA tail domain-interacting protein*); MyoA (*Myosin A*); GAP (*gliding-associated protein*); G-Aktin (*globuläres Aktin*); TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*); CS (*circumsporozoite protein*); GPI (*Glykosylphosphatidylinisitol*). Abbildung modifiziert nach Kappe *et al.*, 2004b.

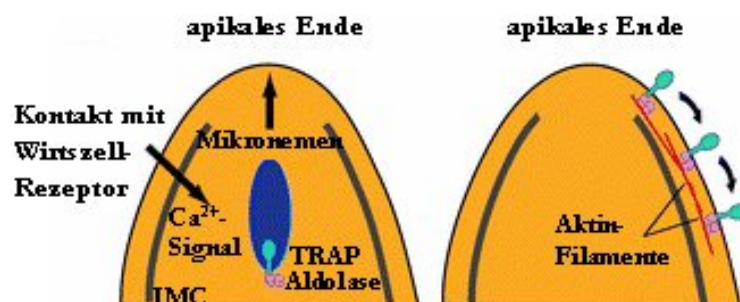
Der MyoA/MTIP/GAP45/GAP50-Komplex ragt in den kortikalen Raum und interagiert dort mit kurzen Aktin-Filamenten (F-Aktin). Die Bildung ausschließlich kurzer Mikrofilamente (Schüler *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2005) lässt darauf schließen, dass die Polymerisation von Aktin der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt während der Bewegung ist und dass es sich hierbei um einen sehr dynamischen und regulierten Prozess handelt.

Das tetramere Protein Aldolase verbindet Rezeptoren der TRAP-Proteinfamilie mit F-Aktin (Jewett und Sibley, 2003; Buscaglia *et al.*, 2003). Dabei ist die Interaktion zwischen Proteinen der TRAP-Familie und Aldolase von den konservierten Aminosäure-Resten in der zyttoplasmatischen Domäne der Oberflächenproteine abhängig (Jewett und Sibley, 2003; Buscaglia *et al.*, 2003), die auch für eine normale Gleitbewegung des Parasiten notwendig sind (Kappe *et al.*, 1999).



Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das Substrat und die Produkte des glykolytischen Enzyms kompetitive Inhibitoren der Interaktion sowohl mit TRAP als auch mit F-Aktin sind (Buscaglia *et al.*, 2003). Womöglich erfolgt hier eine Regulation des Motors durch den Stoffwechsel.

Die Bewegung des Sporozoiten kommt dadurch zustande, dass TRAP durch den Aktin-Myosin-Motor zum posterioren Pol gezogen wird und durch die Bindung der extrazellulären Domäne von TRAP mit dem Substrat eine Vorwärtsbewegung des Parasiten resultiert (Abbildung 1.4). TRAP ist in Mikronemen und an der Zelloberfläche lokalisiert. Durch Kontakt mit dem Substrat (oder Rezeptoren der Wirtszelle) wird die Sekretion der Mikronemen am apikalen Ende des Parasiten aktiviert und führt so zu einer Lokalisation von TRAP an der Zelloberfläche (Gantt *et al.*, 2000). Aldolase ist in ruhenden Sporozoiten im Zytoplasma und an der Oberfläche einiger Mikronemen, wahrscheinlich gebunden an den C-terminus von TRAP, zu finden (Buscaglia *et al.*, 2003). Es wird spekuliert, dass infolge der Aktivierung der Parasiten, TRAP zusammen mit Aldolase an die Oberfläche gelangen und so mit dem Aktin-Myosin-Motor im kortikalen Raum in Kontakt kommen (Abbildung 1.5).



**Abb.1.5: Modell zur Translokation von TRAP/Aldolase von den Mikronemen an die Zelloberfläche bzw. kortikalen Raum.** Links: Durch den Kontakt mit dem Substrat oder Wirtszell-Rezeptor wird die Sekretion von Mikronemen aktiviert. Rechts: TRAP/Aldolase interagiert im kortikalen Raum mit neu gebildeten Aktin-Filamenten bzw. mit dem Motorkomplex. Abbildung modifiziert nach Kappe *et al.*, 2004b.

Eine Voraussetzung für eine kontinuierliche Bewegung ist die Prozessierung von TRAP am posterioren Pol des Parasiten. Eine verkürzte Form des Proteins, ohne die C-terminale Domäne, wird auf dem Substrat hinterlassen (Kappe *et al.*, 1999). Auch große Mengen an CS (*circumsporozoite*)-Protein werden am posterioren Ende des Parasiten während der Gleitbewegung freigesetzt (Stewart und Vanderberg, 1988).

## 1.3 Stadien-spezifische Proteine der invasiven Stadien

### 1.3.1 Sporozoiten

Der Sporozoit ist das einzige invasive Stadium im Lebenszyklus von *Plasmodium*, das fähig ist, völlig unterschiedliche Zelltypen zu invadieren, zu durchqueren und zu verlassen. Sporozoiten, die sich im Mitteldarm-Epithelium des Moskito-Vektors entwickelt haben, werden zunächst in das Hämozoel freigesetzt. Wahrscheinlich erreichen die Sporozoiten die Speicheldrüsen durch einen passiven Transport über die Hämolymphe. Die Sporozoiten müssen dort zuerst die Basallamina und anschließend die sekretorischen Zellen durchqueren, um in den Speichelgang zu gelangen (Sterling *et al.*, 1973; Pimenta *et al.*, 1994).

Während des Stechvorgangs werden die Sporozoiten mit dem Speichel der Mücke in die Haut des Wirbeltier-Wirts injiziert und müssen dort Hautzellen und Endothelzellen der Blutgefäße durchqueren, bevor sie die Blutzirkulation erreichen. Der genaue Weg, wie die Parasiten von der Haut in die Blutzirkulation gelangen, ist noch ungeklärt.

Mit dem Blutstrom erreichen die Sporozoiten in kürzester Zeit die Leber und invadieren Hepatozyten in wenigen Minuten (Shin *et al.*, 1982). Um die Hepatozyten zu erreichen, müssen die Parasiten zuvor die sinusoidale Zellschicht durchqueren. Es ist beschrieben, dass Sporozoiten die Blutsinusoide wahrscheinlich durch eine Passage der Kupffer-Zellen überwinden (Pradel und Frevert, 2001). Auch im Leberparenchym durchwandern die Sporozoiten mehrere Hepatozyten, bis sie in eine Leberzelle unter simultaner Ausbildung einer parasitophoren Vakuole eindringen, sich dort dedifferenzieren und die Replikationsphase einleiten (Frevert, 2004). Die molekularen Mechanismen, die den Übergang von der ausgedehnten Transmigration-Phase zu der Wirtszell-Invasion steuern, sind noch unbekannt.

Es ist beschrieben, dass neben TRAP zwei weitere Oberflächen-Proteine eine wichtige Rolle bei der Invasion in die Speicheldrüsen im Moskito-Vektor spielen. Dabei handelt es sich zum einen um das CS (*circumsporozoite*)-Protein und zum anderen um MAEBL (*apical membrane antigen/ erythrocyte binding-like protein*). CS ist das Hauptoberflächenprotein von Sporozoiten und bildet einen dichten Mantel auf der Oberfläche des Parasiten (Yoshida *et al.*, 1981). Es besitzt extrazellulär zwei Adhäsions-Motive unter denen sich ein TSR befindet. Desweiteren ist eine zentrale *repeat*-Region zu finden, deren Sequenzabfolge Arten-spezifisch ist. CS wird wahrscheinlich über einen GPI (Glykosylphosphatidylinisitol)-Anker an der Plasmamembran verankert. Funktionell ist CS für die Adhäsion von Sporozoiten an die Zielzellen sowohl im Moskito als auch im Säugetier-Wirt (siehe unten) und für die Entwicklung von Sporozoiten im Moskito erforderlich (Ménard *et al.*, 1997). Im Bezug auf die Speicheldrüsen-Invasion gibt es

verschiedene experimentelle Hinweise darauf, dass CS die erste Wechselwirkung der Sporozoiten mit der Basallamina der Speicheldrüsen vermittelt (Sidjanski *et al.*, 1997; Myung *et al.*, 2004). MAEBL ist ein TypI-Transmembranprotein, das bezüglich der extrazellulären Domänen sowohl Ähnlichkeiten zu AMA1 (*apical membrane antigen 1*) als auch zu Proteinen der EBL (*erythrocyte binding ligand*)-Familie aufweist (Kappe *et al.*, 1998). Das Protein ist in Mikronemen und der Zelloberfläche lokalisiert. Mit Hilfe von *MAEBL(-)*-Parasiten konnte gezeigt werden, dass das Protein essentiell für die Infektion der Speicheldrüsen ist (Kariu *et al.*, 2002). Dabei ist es, zusammen mit CS, an der Adhäsion der Sporozoiten an die Speicheldrüsen beteiligt. *TRAP(-)*-Parasiten adhären normal an die Speicheldrüsen, können diese aber nicht invadieren, womit TRAP bei der initialen Adhäsion keine kritische Funktion zu haben scheint. Allerdings führen Mutationen in einer der beiden adhäsiven Domänen von TRAP zu einer erheblich reduzierten Invasion (20 bzw. 80%) der Speicheldrüsen (Matuschewski *et al.*, 2002b). Ob weitere Sporozoiten-Proteine an dem Prozess der Speicheldrüsen-Invasion beteiligt sind, ist noch nicht bekannt. Auch die Rezeptoren auf den Zellen der Speicheldrüsen, die durch die Sporozoiten-Oberflächenmoleküle erkannt werden, sind noch nicht beschrieben.

Um die Barrieren für eine erfolgreiche Infektion der Leberzellen, die für die weitere Entwicklung der Parasiten essentiell ist, zu überwinden, verwendet der Sporozoit zwei Invasionsstrategien. Zum einen geschieht dies über eine lokale Zerstörung der Plasmamembran und anschließender Transmigration der Wirtszelle und zum anderen durch die Bildung einer parasitophoren Vakuole, wodurch ein Kompartiment zur weiteren Entwicklung des Parasiten geschaffen wird. Bei diesen Prozessen ist, neben dem Sporozoiten-Invasin TRAP, eine Vielzahl von Proteinen beteiligt. Die erste Erkennung des Zielorgans (*homing*) wird durch CS vermittelt (Cerami *et al.*, 1992; Frevert *et al.*, 1993). Es wird vermutet, dass CS (und auch TRAP) mit Proteoglykanen der extrazellulären Matrix interagiert, die durch winzige Spalten des Endotheliums in das sinusoidale Lumen ragen (Pradel *et al.*, 2002). Desweiteren erkennen sowohl TRAP als auch CS Glykosaminoglykane der Leberzellen und Kupffer-Zellen, jedoch nicht von sinusoiden Endothelzellen. Die Transmigration von Zellen ist auch bei der Infektion der Leber von erheblicher Bedeutung. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Sporozoiten die Sinusoid-Barriere durch Kupffer-Zellen passieren (Meis *et al.*, 1983; Pradel und Frevert, 2001; Ishino *et al.*, 2004). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Sporozoiten sich nicht in der ersten invadierten Zelle entwickeln, sondern durch mehrere Leberzellen migrieren (Mota *et al.*, 2001). Proteine, die bei der Transmigration eine Rolle spielen, konnten vor kurzem identifiziert werden. Diese umfassen SPECT (*sporozoite microneme protein essential for cell traversal*) (Ishino *et al.*, 2004), PPLP1/SPECT2

(*Plasmodium perforin-like protein/ sporozoite microneme protein essential for cell traversal 2*) (Kaiser *et al.*, 2004; Ishino *et al.*, 2005) und CelTOS (*cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites*) (Yuda und Ishino, 2004).

Bei der, für die weitere Entwicklung der Sporozoiten erforderlichen, Invasion von Hepatozyten, die mit der Bildung einer parasitophoren Vakuole begleitet wird, wird eine *tight junction* zwischen apikalem Ende des Parasiten und Plasmamembran der Wirtszelle aufgebaut. Die an der Ausbildung der *junction* beteiligten und beschriebenen Proteine sind CS und TRAP, wobei CS wichtig für die Adhäsion der Sporozoiten an die Wirtszelle und TRAP essentiell für das Eindringen der Parasiten in die Wirtszelle ist. Die Translokation der *tight junction* zum posterioren Pol des Parasiten wird dabei höchstwahrscheinlich durch TRAP vermittelt.

Für eine erfolgreiche Invasion, wie auch für eine kontinuierliche Bewegung, ist die Prozessierung der Adhäsionsproteine/Invasine während der Penetration von Bedeutung. Diese wird durch Parasiten-eigene Proteasen vermittelt (Carruthers und Blackman, 2005).

In den vergangenen Jahren konnten, unter anderen durch Transkriptom-Analysen, weitere Sporozoiten-Proteine identifiziert werden, wobei deren genaue Funktion bei der Hepatozyten-Invasion noch weitgehend unbekannt ist. Einige dieser Proteine sind auch in Blut- und Leberstadien exprimiert. In diesem Zusammenhang sind unter anderen STARP (*sporozoite threonine asparagine-rich protein*) (Fidock *et al.*, 1994), SPATR (*sporozoite protein with an altered thrombospondin domain*) (Kappe *et al.*, 2001) und SALSA (*sporozoite and liver-stage antigen*) (Bottius *et al.*, 1996) zu nennen. Antikörper sowohl gegen STARP als auch gegen SPATR inhibieren die Invasion in Leberzellen (Pasquetto *et al.*, 1997; Chattopadhyay *et al.*, 2003). Desweiteren konnte die Expression der in Blutstadien beschriebenen Proteine EBA175 (*erythrocyte binding ligand 175*) und AMA1 (*apical membrane antigen 1*) in Sporozoiten nachgewiesen werden (Grüner *et al.*, 2001; Silvie *et al.*, 2004). Für AMA1 konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen das Protein die Infektion von Leberzellen *in vitro* inhibieren (Silvie *et al.*, 2004).

Erst kürzlich konnte durch reverse Genetik gezeigt werden, dass zwei Gene der *Plasmodium* 6-Cystein-Motiv Proteinfamilie (*Pbs36p* und *Pbs36*), essentiell für die Infektion der Leberzellen sind (van Dijk *et al.*, 2005; Ishino *et al.*, 2005).

Als mögliche Wirtszell-Rezeptoren konnten bislang ausschließlich HSPGs (*heparan sulfate proteoglycans*), die mit der TSR-Domäne (von TRAP und auch CS) interagieren, eine direkte Funktion bei der Sporozoiten-Invasion in Leberzellen zugeteilt werden (Robson *et al.*, 1995; Frevort *et al.*, 1996; Matuschewski *et al.*, 2002b). Kürzlich konnte für *P. falciparum* und *P. yoelii* die essentielle Funktion von *CD81*, einem Mitglied der Tetraspanin-Superfamilie, für die Invasion in

Leberzellen gezeigt werden (Silvie *et al.*, 2003). Allerdings ist *CD81* für die Hepatozyten-Invasion durch *P. berghei*-Sporozoitien nicht von Bedeutung. Somit scheint *CD81* keine allgemeine Rolle während der Invasion in Leberzellen zu haben (Silvie *et al.*, 2003). Außerdem konnte Fetuin-A, ein Leberzellen-spezifisches Protein, als Interaktionspartner der A-Domäne von TRAP identifiziert werden (Jethwaney *et al.*, 2005). Antikörper gegen Fetuin-A inhibieren die Invasion von Hepatozyten und nach der Injektion von Sporozoitien konnte in Fetuin-A-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verzögerte Blutstadien-Infektion nachgewiesen werden.

### 1.3.2 Ookineten

Während der Blutmahlzeit von Moskitos aufgenommene Gametozyten differenzieren sich im Mitteldarm-Lumen zu Gameten, wonach die Fertilisation und die Entwicklung der Zygote zum Ookineten stattfinden. Die Ookineten-Entwicklung findet in der Chitin-haltigen peritrophen Membran, die um die Blutmahlzeit gebildet wird, statt. Nach der Passage der peritrophen Membran müssen die Ookineten zur weiteren Entwicklung das Mitteldarm-Epithelium durchqueren. Dabei wird die penetrierte Zelle erheblich geschädigt, was zum Absterben der Zelle führt (Han *et al.*, 2000). Das Epithelium wird allerdings durch eine Abschnürung der zerstörten Zelle (*bud off*) wieder hergestellt, ohne dass dabei die Integrität des Epitheliums verloren geht. Die Differenzierung zu Oozysten findet im extrazellulären Raum zwischen Epithelium und Basallamina statt.

Der Ookinet überwindet die Barrieren aktiv durch Transmigration. Der Ookinet ist das einzige invasive Stadium im *Plasmodium*-Lebenszyklus das keine parasitophore Vakuole ausbildet. Dies steht in guter Korrelation mit dem Fehlen bestimmter sekretorischer Organellen, den Rhoptrien, deren Inhalte für die Ausbildung dieses Kompartiments wichtig sind (Hall *et al.*, 2005).

Neben CTRP, das essentiell für die Bewegung der Ookineten und die Invasion des Mitteldarm-Epitheliums ist (Dessens *et al.*, 1999; Templeton *et al.*, 2000), sind weitere Proteine für die erfolgreiche Überwindung der Barrieren notwendig.

Für das Passieren der peritrophen Membran spielen Chitinasen eine wichtige Rolle, die als nicht-aktive Formen vom Parasiten ausgeschüttet werden und durch Proteasen im Mitteldarm aktiviert werden (Shahabuddin *et al.*, 1993; Vinetz *et al.*, 2000; Dessens *et al.*, 2001).

Weitere Proteine, die bei der Transmigration des Mitteldarm-Epitheliums eine Rolle spielen sind MAOP (*membrane attack ookinete protein*) (Kadota *et al.*, 2004) und CeTOS (*cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites*) (Yuda und Ishino, 2004).

SOAP (*secreted and soluble protein*), ein in den Mikronemen lokalisiertes und lösliches Protein, interagiert mit Laminin des Moskito-Vektors (Dessens *et al.*, 2003). Deletion des Gens beeinträchtigte die Fähigkeit der Ookineten das Mitteldarm-Epithelium zu invadieren und Oozysten zu bilden.

Die Rezeptoren auf dem Mitteldarm-Epithelium, die durch Ookineten erkannt werden, sind nicht bekannt. Lediglich die Bindung von Ookineten an Kohlenhydrat-ähnliche Moleküle im Mitteldarm-Epithelium konnte beschrieben werden (Zieler *et al.*, 1999).

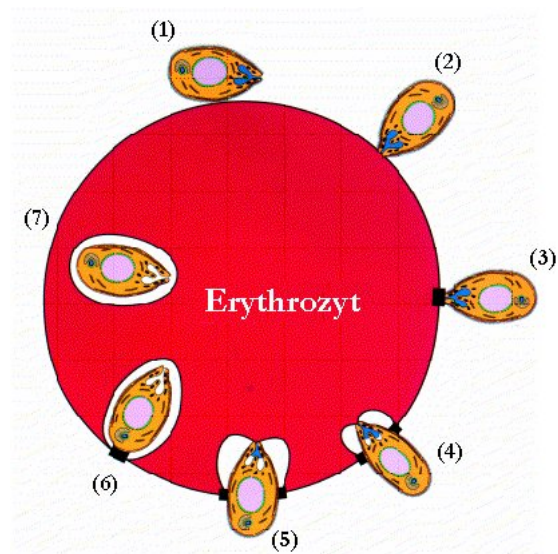
### 1.3.3 Merozoiten

Auch die Invasion von Erythrozyten durch Merozoiten ist ein komplexer Prozess, der in mehreren Schritten abläuft und an dem eine Vielzahl an Proteinen beteiligt ist. In einem ersten Schritt adhären Merozoiten mit einer beliebigen Stelle reversibel an die Erythrozyten-Oberfläche. Im Anschluss an die Re-Orientierung des Parasiten, durch die das apikale Ende des Merozoiten mit der Wirtszellmembran in Kontakt kommt, kommt es zu der Bildung einer festen, irreversiblen Bindung. Diese wird begleitet durch die Bildung einer elektronendichten Verbindung (*tight junction*) zwischen dem apikalen Pol des Merozoiten und der Wirtszellmembran. Es folgt die eigentliche Invasion, bei der die *junction* über die Merozoiten-Oberfläche zum posterioren Pol bewegt wird (*moving junction*), während der Parasit vorwärts in eine Invagination der Erythrozytenmembran, der parasitophoren Vakuole, gleitet (Dvorak *et al.*, 1975; Aikawa *et al.*, 1978). Dabei wird der Proteinmantel, der den extrazellulären Merozoiten umgibt, abgestreift. Es wird vermutet, dass sich die gebildete Vakuole hinter dem Parasiten durch die Fusion der Membran schließt. Dieser ganze Invasions-Prozess ist innerhalb von zirka 30 Sekunden abgeschlossen.

Zahlreiche Oberflächen- und in den sekretorischen Organellen lokalisierte Proteine, die an der Invasion beteiligt sind, konnten in den vergangenen Jahren beschrieben werden. Die Invasion von Erythrozyten durch Merozoiten erfordert auch die aktive Bewegung des Parasiten, um die Re-Orientierung und den Eintritt in die Wirtszelle auszuführen. Allerdings konnte für dieses invasive Stadium noch kein Protein nachgewiesen werden, das, in Analogie zu TRAP (und CTRP), als Bindeglied zwischen Rezeptor/Liganden-Interaktion und dem molekularen Motor der Merozoiten (Pinder *et al.*, 1998; Green *et al.*, 2006) fungieren könnte.

**Abb.1.6: Invasionsprozess von roten Blutkörperchen durch *Plasmodium* Merozoiten.**

Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte während der Invasion von Erythrozyten. (1) Reversible Bindung der Merozoiten an die Erythrozytenmembran. (2) Re-Orientierung des apikalen Pols. (3) Irreversible Bindung, begleitend mit der Ausbildung der *tight junction*. (4-5) Invasion. Der Merozoiten bewegt sich in die sich bildende parasitophore Vakuole. (6-7) Aufhebung der *junction* und Fusion der Erythrozytenmembran. Abbildung modifiziert nach Cowman *et al.*, 2000.



Außerdem scheinen an dem Erkennungsprozess der Wirtszelle mehrere Faktoren beteiligt zu sein, die aber nicht alle eine essentielle Funktion ausüben, sondern eventuell ergänzend wirksam sind. So benötigen manche *P. falciparum*-Stämme Sialinsäure auf der Erythrozyten-Oberfläche (Camus und Hadley, 1985), andere wiederum verwenden einen Sialinsäure-unabhängigen Invasionsweg (Hadley *et al.*, 1987).

Diesbezüglich ist auch die Präferenz der jeweiligen *Plasmodium*-Arten für die Invasion von Retikulozyten oder/und Erythrozyten zu nennen, welches das Spektrum an beteiligten Proteinen erweitert. Es ist bekannt, das z.B. *P. vivax* ausschließlich Retikulozyten penetriert, wobei *P. berghei* und *P. yoelii* sowohl Retikulozyten als auch Erythrozyten invadieren. In *P. vivax* konnten Proteine, die Retikulozyten erkennen, identifiziert werden (Galinski *et al.*, 1992). Sie gehören einer Proteinfamilie (*reticulocyte binding like protein family*) an, deren Mitglieder auch in *P. falciparum* und *P. yoelii* zu finden sind, die jedoch wahrscheinlich andere Rezeptoren als das Retikulozyten-Rezeptor-Molekül auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen erkennen.

Im Folgenden sollen drei der am besten charakterisierten Proteine beschrieben werden, die an der Invasion von Erythrozyten beteiligt sind. Darunter befinden sich MSP-1, AMA1 und EBA175.

Die MSP (*merozoite surface protein*)-Familie ist *Plasmodium*-spezifisch und umfasst einige Mitglieder, wobei MSP-1 (Holder *et al.*, 1985) das am besten charakterisierte Protein darstellt. MSP-1 ist das Hauptoberflächenprotein der Merozoiten und ist C-terminal über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden (Gerold *et al.*, 1996). Das Protein wird während der späten Phase der Schizogonie und nach der Freilassung der Merozoiten mehrfach proteolytisch prozessiert

(Holder und Freeman, 1982; Cooper, 1993). Durch genetische Experimente wurde deutlich, dass MSP-1 essentiell für die Invasion bzw. die Blutstadienentwicklung ist, denn es war nicht möglich, das Gen auszuschalten (O'Donnell *et al.*, 2000). Desweiteren blockierten spezifische Antikörper gegen MSP-1 die Invasion von Erythrozyten *in vitro*. Durch die Verteilung von MSP-1 über die Oberfläche des Merozoiten wird vermutet, dass es die erste Interaktion mit dem Erythrozyten vermitteln könnte (Gaur *et al.*, 2004). Kürzlich konnte die Bindung von *P. falciparum* MSP-1 an das Erythrozyten-Oberflächenprotein Bande 3, einem Membrantransport-Glykoprotein, nachgewiesen werden (Goel *et al.*, 2003). Allerdings ist die genaue Funktion von MSP-1 noch nicht bekannt.

AMA1 (*apical membrane antigen 1*) (Deans *et al.*, 1984; Peterson *et al.*, 1989), ein TypI-Transmembranprotein, wird im späten Schizonten-Stadium des asexuellen Blutstadien-Zyklus exprimiert und konnte vor kurzem außerdem in Speicheldrüsen-Sporozoiten nachgewiesen werden (Silvie *et al.*, 2004). Homologe von AMA1 sind auch in anderen *Apicomplexa*-Parasiten, wie z.B. *Toxoplasma gondii* zu finden. AMA1 ist ein konserviertes Protein innerhalb des Phylums *Apicomplexa* (Waters *et al.*, 1990; Donahue *et al.*, 2000; Gaffar *et al.*, 2004b).

*P. falciparum* AMA1 wird als 83kDa-Vorstufe synthetisiert, von der eine N-terminale Pro-Domäne abgespalten wird (Narum und Thomas, 1994; Howell *et al.*, 2001). In anderen *Plasmodium*-Arten wird AMA1 als 66kDa-Protein synthetisiert. In *P. falciparum* konnte gezeigt werden, dass die prozessierte 66kDa-Form des Proteins in den Mikronemen lokalisiert ist (Healer *et al.*, 2002; Bannister *et al.*, 2003). Wie bei MSP-1 findet auf der Merozoiten-Oberfläche eine weitere Prozessierung von AMA1 statt (Howell *et al.*, 2001). Die Ektodomäne von AMA1 enthält 16 Cystein-Reste, die innerhalb aller *Plasmodium*-Arten konserviert sind (Hodder *et al.*, 1996), und kann durch die intramolekularen Disulfidbindungen in drei Domänen eingeteilt werden. Auch die zytoplasmatische Domäne von AMA1 ist innerhalb der *Plasmodium*-Arten konserviert. Eine Funktion von AMA1 bei der Invasion wird durch verschiedene Studien unterstützt. Sowohl Antikörper gegen das Protein (Thomas *et al.*, 1984; Kocken *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2004) als auch von AMA1 abgeleitete Peptide (Urquiza *et al.*, 2000) und Peptide, mit Affinität zu AMA1 (Li *et al.*, 2002) blockierten *in vitro* die Erythrozyten-Invasion durch *Plasmodium*-Parasiten. Auch bei Sporozoiten inhibierten Antikörper gegen AMA1 die Invasion der Parasiten in Leberzellen (Silvie *et al.*, 2004). Durch heterologe Expressions-Systeme konnte die Bindung von AMA1 bzw. Domänen des Proteins an rote Blutkörperchen nachgewiesen werden (Fraser *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2005). Desweiteren konnten in *Plasmodium* keine AMA1-Deletionsmutanten hergestellt werden (Triglia *et al.*, 2000). Jedoch konnte die Funktion von *Pf* AMA1 durch ein AMA1-Transgen von *P. chabaudi*, einem Nagetier-Parasiten, teilweise komplementiert werden (Triglia *et*



*al.*, 2000). Diese transgenen Parasiten invadierten humane Erythrozyten in Anwesenheit von Antikörpern gegen *Pf*AMA1 zu 35%. Mitchell *et al.* konnten mit Hilfe von Elektronenmikroskopie zeigen, dass in der Anwesenheit eines Invasions-blockierenden Antikörpers gegen AMA1 die Merozoiten von *P. knowlesi* zwar normal an die Erythrozyten-Oberfläche adhären können, jedoch nicht zur apikalen Re-Orientierung fähig sind (Mitchell *et al.*, 2004). Basierend darauf folgerten die Autoren, dass AMA1 eine Rolle bei der Re-Orientierung der Parasiten oder der Ausbildung der *tight junction* ausüben könnte. Einen direkten genetischen Beweis dafür, dass AMA1 bei der Invasion eine Rolle spielt, konnte vor kurzem in *Toxoplasma gondii* gezeigt werden. Durch konditionale Mutagenese konnte *Tg* AMA1 deletiert werden, wodurch die Parasiten in ihrer Fähigkeit Wirtszellen zu invadieren, erheblich beeinträchtigt wurden (Mital *et al.*, 2005). In diesen *Tg* AMA1-deletierten Parasiten war die Sekretion der Rhoptrien inhibiert.

EBA175 (*erythrocyte binding antigen 175*), ein Mitglied der DBL/EBL-Superfamilie (*duffy-binding-like/erythrocyte-binding-like*), ist das erste *erythrocyte binding protein* welches in *P. falciparum* identifiziert wurde (Camus und Hadley, 1985). EBA175 ist ein TypI-Transmembranprotein und enthält extrazellulär zwei Cystein-reiche Domänen, eine N-terminale DBL-Domäne und eine C-terminale Domäne nahe der Transmembrandomäne. Die DBL-Domäne vermittelt die Interaktion mit dem Rezeptor auf den roten Blutkörperchen (Adams *et al.*, 2001). EBA175 ist wie AMA1 ein Mikronemen-Protein (Sim *et al.*, 1992). Das Protein ist in asexuellen Blutstadien, in Leberstadien und auch in Speicheldrüsen-Sporozoiten exprimiert (Grüner *et al.*, 2001). Auch EBA175 wird auf der Oberfläche von Merozoiten prozessiert (Orlandi *et al.*, 1990; Carruthers und Blackman, 2005). EBA175 bindet Sialinsäure-abhängig an die Erythrozyten-Oberfläche (Camus und Hadley, 1985) und hier spezifisch an Glykophorin A (Sim *et al.*, 1994). Sowohl die Anwesenheit von Sialinsäure-Reste als auch die Aminosäure-Sequenz von Glykophorin A spielen dabei eine Rolle, denn EBA175 bindet nicht an Glykophorin B. Die Interaktion zwischen EBA175 und Glykophorin A scheint in vielen, aber nicht allen *P. falciparum*-Stämmen wichtig zu sein. Dies konnte durch eine Antikörper-vermittelte Inhibition des Invasionsprozesses gezeigt werden (Sim *et al.*, 1990; Pandey *et al.*, 2002). Jedoch ist EBA175 für die Merozoiten-Invasion nicht essentiell, da einige *P. falciparum*-Klone, in denen EBA175 deletiert wurde, andere Invasions-Wege nutzen können (Reed *et al.*, 2000; Duraisingh *et al.*, 2003). Die zytoplasmatische Domäne von EBA175 spielt bei der Invasion von Erythrozyten über den Glykophorin A-abhängigen Weg eine wichtige Rolle (Gilberger *et al.*, 2003). Außerdem konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne von EBA175 durch die entsprechende Domäne von TRAP ersetzt werden kann. Basierend darauf wurde EBA175 als das

TRAP-Paralog in Blutstadien postuliert bzw. dass der Parasit unabhängig von dem Wirtszelltyp und invasiven Stadium die gleichen Komponenten der zellulären Maschinerie für die Invasion verwendet (Gilberger *et al.*, 2003).

Darüber hinaus konnten im Genom von *P. falciparum* weitere Mitglieder der EBL-Familie, identifiziert werden, darunter EBA140 (BaebI) und EBA181 (Jesbl) (Adams *et al.*, 2001). Wie bei EBA175 konnten EBA181 und EBA140 in einigen *P. falciparum*-Stämmen deletiert werden, was für eine redundante Funktion der jeweiligen Proteine in verschiedenen Parasiten-Stämmen spricht.

Trotz der Vielzahl der charakterisierten Merozoiten-Proteine sind die molekularen Mechanismen der Merozoiten-Invasion bislang weitestgehend spekulativ. Insbesondere fehlen Nachweise für eine direkte Rolle während des aktiven Eintritts in den Erythrozyten.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte versucht werden, auf der Grundlage der bekannten Mechanismen von *Plasmodium*-Sporozoiten, mögliche Kandidaten für Invasine zu charakterisieren und funktionell zu testen.

Durch die Suche nach weiteren Proteinen in der *P. falciparum*-Datenbank, die Ähnlichkeiten zu Proteinen der TRAP-Familie aufweisen, konnte ein Protein identifiziert werden, das die strukturellen Charakteristika von Proteinen dieser Familie aufweist. Zur Charakterisierung des Proteins, das TLP1 (*TRAP-like protein 1*) bezeichnet wurde, sollte zunächst die Expression auf Transkript- und Protein-Ebene in verschiedenen Stadien des *Plasmodium*-Lebenszyklus untersucht werden. Durch Deletion des Proteins sollte weiterhin die Funktion von TLP1 analysiert werden. Aufgrund der strukturellen Homologie zu Invasinen der TRAP-Familie wurde eine Rolle bei Prozessen wie Invasion und Bewegung vermutet. Diese Hypothese sollte mit Hilfe einer *in vivo*-Komplementations-Strategie Proteine der TRAP-Familie basierend auf funktionellen Kriterien getestet und potentielle Invasine identifiziert werden. Diese Studien sollten zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Wirtszellinvasion des Malaria-Parasiten beitragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Analytische Waage	Sartorius GmbH, Göttingen BL510
Autoklav	Systemec GmbH, Wetzlar
Agarosegelapparatur	GibcoBRL, Karlsruhe
Blotapparatur (Mini Tank Transfer Unit)	Hofer
Computer-Hardware	
PC	diverse Hersteller
Computer-Software	
Adobe Photoshop®	Adobe Systems Inc, USA
MS Word XP	Microsoft Corporation, CA, USA
MS Excel XP	Microsoft Corporation, CA, USA
Opera 7.0	Opera Software ASA, Norwegen
Paint Shop Pro 7	Jasc Software, USA
Clone Manager 6.0	Sci Ed Central Software, USA
Drucker	
HP Laserjet 4100	Hewlett-Packard, USA
Drehrad	Stuart, VWR, Darmstadt
Entwicklungsmaschine Hyperprocessor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Eismaschine AF30	Scotsman
Elektroporationsgerät	BioRad, München
Feinwaage	Sartorius GmbH, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100M	Zeiss, Jena
Gefrierschränke	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Sanyo
Heizblock	Alpha Laboratories, DB 1010
Inkubatoren:	
Hera Cell	Heraeus Instruments, Hanau
Mytron	Mytron, Heiligenstadt
Cytosperm2	Heraeus Instruments, Hanau
Kamera (Gelfotografie)	DC120 Zoom Digital Kodak, USA

Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus sepatech, Hanau
Lichtmikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
MACS Vario Magnet	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikrowelle	LG
Magnetheizrührer	Heidolph, MR 3001
Netzwerk Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Electrophoresis Power Supply, EPS301, Stuart
pH-Meter	Inolab
PCR-Maschine	Gene Amp, PCR System 9700, Applied Biosystems, USA
Pipetman Gilson P2, P20, P200, P1000	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
SDS-Gelapparatur	Hoefler
Sonifier® B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Sterilbank:	
Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
SterilGARD ClassII Type A/B 3	The Baker Company, USA
Stickstofftank	CBS, USA
Spektrophotometer GeneQant pro	Amersham, Freiburg
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Innova, 4300
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415 R, Eppendorf
UV-Tischlampe	Gibco BRL, Scientific Industries
Vortex-Genie	Scientific Industries Roth, Karlsruhe
Wasserbad Julabo 7 A	Julabo
Zentrifuge J2-MC	Beckman
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Hanau

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Chambersslides	LabTek
Deckgläschen	Knittel
Einmalröhrchen, Polystyren-6,0/38mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmalröhrchen, Polystyren-12/75mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmalröhrchen PP-Tube 18,0/95mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmalküvetten	Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten (1, 2, 10 und 25ml)	Corning Incorporation, Bodenheim
Faltenfilter	Schleicher und Schuell, Einbeck
Gewebekulturschalen (Ø 100/20mm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Handschuhe	VZM, Heidelberg
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Kanülen	BD Microlance, Becton Dickinson
Kodak BioMax XAR Film	Sigma, Taufkirchen
Kryo-Röhrchen	NALGENE®
Nitrocellulosemembran, Hybond	Amersham, Freiburg
Objektträger	Menzel
8-well	Medco
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten	WU Mainz
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Petrischalen (Ø 145/20mm bzw. 94/16mm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen, gestopft	Greiner Labortechnik, Nütringen
Sterilfilter (Ø 0,2µm)	Schleicher und Schuell, Einbeck
Sterilfiltrationseinheiten (500ml)	NALGENE®
Spritzen	BD Diskardit, Becton Dickinson
Schraubdeckel-Reaktionsgefäße	NeoLab, Heidelberg
Whatman™ 3MM paper	Firma Whatman Paper Company
Zellkulturflaschen 25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> (TPP)	Renner, Dannstadt-Schauernheim

### 2.1.3 Chemikalien und Materialien

Alle Standardchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Merck, Sigma, Serva und AppliChem über die Chemikalienausgabe des Theoretikums der medizinischen Fakultät Heidelberg bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid, Protogel	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Alsever's Solution	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
4-Aminobenzoesäure (pABA)	Sigma, Taufkirchen
Bacto™-Agar	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto™-Trypton	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto™-Pepton	Difco Laboratories, Augsburg
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Bovine Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
<i>Carrier</i> -DNA; Heringssperma-DNA	Clontech, Heidelberg Roche, Mannheim
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chemilumineszent Substrat	Amersham, Freiburg
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (2mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Diethylether	Riedel-de Haen
DMEM-Medium (high Glucose)	GibcoBRL, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
EDTA (Na <sub>2</sub> EDTA)	Roth, Karlsruhe
Expositionskassette	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
FCS, zertifiziert (USA)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Fibrose Cellulose Powder CF11	Whatman, Großbritannien
Formaldehyd	Merck, Darmstadt

Fluocytosin	Fluka, Buchs, Schweiz
Gentamycin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Giemsa (0,4%, w/v)	BDH Laboratory Supplies
Glass beads	Sigma, Taufkirchen
212-300 micron, unwashed	
425-600 micron, acid washed	
Glasplatten (SDS-Gel)	Amersham, Freiburg
D-(+) Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Riedel-de-Haën
Harnstoff	Grüssing, Filsum
HBSS	GibcoBRL, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
Heparin	Braun, Melsungen
Humanes Blutplasma	Blutbank, Heidelberg
Humanes Blut (Erythrozytenkonzentrat)	Blutbank, Heidelberg
Hypoxanthin	C.C.pro GmbH, Neustadt
Isopropyl-1thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen
Isoamylalkohol	Grüssing, Filsum
Kaliumchlorid	Applichem, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Ketamin (10%)	VFW
Lithiumacetat	Sigma, Taufkirchen
	Clontech, Heidelberg
MACS Vario Magnetsäule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Meersalz	Alnatura
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Moskito-Käfige	BioQuip Products Inc, USA
Natriumacid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nycodenz	Axis Shield, Oslo, Norwegen
Neubauer Zählkammer	Labotec, Labor-Technik, Göttingen
PCR-Pufferset	Roche, Mannheim



PBS	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
PBS-Tabletten	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Fluka, Buchs, Schweiz
Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10000µg/ml)	GibcoBRL, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG 4000)	Sigma, Taufkirchen Clontech, Heidelberg
Proteaseinhibitoren	Roche, Mannheim
Pyrimethamin	Sigma, Taufkirchen
Quarzküvette	Amersham, Freiburg
RPMI 1640-Medium (+25mM HEPES, + L-Glutamin)	GibcoBRL, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Taufkirchen
SDS (sodium dodecyl sulphate)	Merck, Darmstadt
Sucrose	Riedel-de-Haën
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	GibcoBRL, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween20	Merck, Darmstadt
TRIS	Roth, Karlsruhe
Xylazinhydrochlorid (2% Xylazin)	Rompun <sup>®</sup> , Bayer
Yeast Nitrogen Base (YNB)	BD Becton Dickinson

## **2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen**

### **2.1.4.1 Biochemisches Arbeiten**

#### **2.1.4.1.1 SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting**

TRIS-Glycin Elektrophoresepuffer	250mM Glycin, 25mM TRIS, 0,1% SDS
TRIS, pH 6,8	1M TRIS; pH 6,8
TRIS, pH 8,8	1,5M TRIS; pH 8,8
2x SDS-Ladepuffer	250mM TRIS pH 6,8, 6,6% SDS, 24% Glycerin, 10mM EDTA, 6% β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau
10x Transferpuffer	20mM TRIS, 144mM Glycin, 0,01% SDS

1x Transferpuffer	100ml 10x Transferpuffer, 200ml Methanol, ad 1l
TBST	20mM TRIS pH 7,6, 137mM NaCl, 0,1% Tween20
Coomassie-Färbelösung	50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,125% Brillant Blue R-250
Coomassie-Entfärbelösung	50% Methanol, 10% Essigsäure

#### **2.1.4.1.2 Proteinüberexpression**

IPTG Stock	1M in ddH <sub>2</sub> O
Proteaseinhibitoren Stock (25x)	1 Tablette in 2ml ddH <sub>2</sub> O
Lysis-Puffer	20mM TRIS pH 7,5, 100mM KCl, 1mM DTT

Die Zugabe der Proteaseinhibitoren (Endkonzentration 1x) erfolgte kurz vor Gebrauch des Lysis-Puffers.

Lysozym Stock	10mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
---------------	-------------------------------

#### **2.1.4.1.3 Yeast-two-hybrid-System**

YPD-Medium	2% Bacto-Pepton, 1% Hefeextrakt, 2% Glucose
YPD-Agar	2% Agar in YPD-Medium
SD-Medium (500ml)	Dropout-Medium (Mengen nach Herstellerangaben), 50ml 20% Glucose, 50ml 10x YNB
SD-Agar	2% Agar in SD-Medium
10x Yeast Nitrogen Base (YNB)	6,7g auf 100ml ddH <sub>2</sub> O, steril filtriert
<i>Dropout</i> -Medium	Clontech Laboratories, Heidelberg; Qbiogene, Heidelberg
-Trp	
-Leu	
-Trp-Leu	
-Trp-His	
-Trp-Leu-His-Ade	

angesetzt nach Herstellerangaben.

50% Polyethylenglycol (PEG) 4000	gelöst in ddH <sub>2</sub> O, autoklaviert
10x Lithiumacetat (LiAc)	1M Lithiumacetat, pH 7,5, autoklaviert
10x TE-Puffer	0,1M TRIS/HCl, 10mM EDTA, pH 7,5 autoklaviert
PEG/LiAc	8ml 50% PEG 4000, 1ml 10x TE, 1ml 10x LiAc Vor Gebrauch immer frisch angesetzt.
1,1x LiAc/TE	1,1ml 10x TE, 1,1ml 10x LiAc ad 10ml mit ddH <sub>2</sub> O Vor Gebrauch immer frisch angesetzt.
<i>Cracking</i> -Puffer Stock (Proteinisolation)	8M Harnstoff, 5% SDS, 40mM TRIS pH 6,8, 0,1mM EDTA, 0,4mg/ml Bromphenolblau
<i>Cracking</i> -Puffer <i>complete</i>	1ml <i>Cracking</i> -Puffer Stocklösung, 10µl β-Mercaptoethanol, 45,2µl 25x Proteaseinhibitoren, 74,8µl ddH <sub>2</sub> O

Das angegebene Volumen bezieht sich auf die Lyse eines Ansatzes.

Lysis-Puffer (Plasmidisolation)	2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM TRIS/HCl pH 8,0, 1mM EDTA
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	im Verhältnis 25:24:1
Hefestabilate	250µl Glycerin, 1ml Übernachtskultur

## **2.1.4.2 Mikrobiologisches Arbeiten**

### **2.1.4.2.1 Antibiotika**

Ampicillin Stock	100mg/ml Ampicillin in ddH <sub>2</sub> O
Tetracyclin Stock	5mg/ml Tetracyclin in 70% Ethanol
Chloramphenicol Stock	30mg/ml Chloramphenicol in ddH <sub>2</sub> O
Kanamycin Stock	50mg/ml Kanamycin in ddH <sub>2</sub> O

Die Stocklösungen wurden steril filtriert und für die jeweilige Endkonzentration 1:1000 verdünnt.

### **2.1.4.2.2 Bakterien-Medien**

Luria Broth-(LB)-Medium (Sambroock <i>et al.</i> , 1989)	10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl; pH 7,5
--	---

LB-Agar LB-Medium, 15g/l Agar

### 2.1.4.3 Molekularbiologisches Arbeiten

3M Natriumacetat 40,8g ad 100ml ddH<sub>2</sub>O; pH 4,8  
 TAE-Puffer (50x) 2M TRIS, 1M Essigsäure, 50mM EDTA  
 (pH 8)

### 2.1.4.4 Parasiten-Medien

Transfektions-Kulturmedium (pro Kultur) 141,25ml RPMI-Medium 1640 (+ 25mM  
 HEPES, + L-Glutamin), 35ml FCS,  
 50µl Gentamycin; steril filtriert

Das fötale Kälberserum (FCS; USA) wurde vor der Zugabe bei 56°C für 30 Minuten hitze-  
 inaktiviert.

Einfrierlösung (*Freezing-Solution*) Glycerin:Alsever's Solution (1:9)  
 Sporozoiten-Isolationsmedium 3% BSA in RPMI-Medium 1640 (+ 25mM  
 HEPES, + L-Glutamin)

Gametozyten-Anreicherungsmedium  
     Minimal-Medium *incomplete* 20mM Hepes, 20mM Glucose, 4mM  
     Natriumbicarbonat, 10ml  
     Penicillin/Streptomycin ad 1l mit 1x PBS  
     (Gibco), pH 7,25-7,3; steril filtriert  
     Minimal-Medium *complete* 5% FCS in *incomplete* Medium

### 2.1.4.5 Zellkultur

Hepatozyten-Medium 450ml DMEM (high Glucose), 50ml FCS,  
 5ml Penicillin/Streptomycin; steril filtriert  
*Freezing-Solution* Hepatozyten 10% DMSO, 90% FCS  
 Round-Up 100x 60mg Penicillin, 100mg Kanamycin, 50mg  
 Fluocytosin, 10mg Chloramphenicol; steril  
 Filtriert

<i>P. falciparum</i> Kulturmedium	RPMI-Medium 1640 (+ 25mM HEPES, + L-Glutamin), 10% Humanserum, 10mM Hypoxanthin, 4µg/ml Gentamycin
<i>P. falciparum</i> Einfrierlösung	28% Glycerol, 3% Sorbitol, 0,65% NaCl; steril filtriert
MACS Säulenpuffer	0,5% BSA, 2mM EDTA in PBS

Die Zugabe von BSA erfolgte kurz vor Gebrauch des Puffers.

### 2.1.4.6 Moskito-Aufzucht

Mücken-Aufzuchtswasser	1‰ Meersalz in ddH <sub>2</sub> O
10% Sucrose-Nährlösung	10g Sucrose, 20µg pABA ad 100ml ddH <sub>2</sub> O

### 2.1.5 Größenmarker und Ladepuffer für die Elektrophorese

1kb DNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Rainbow Protein Marker RPN800V	Amersham Life Science, Freiburg
6x Ladepuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.6 Stämme und Vektoren

#### 2.1.6.1 *Escherichia coli*-Stämme

XL-1 Blue	Stratagene
BL21-CodonPlus-RIPL	Stratagene
BL21-CodonPlus-RIL	Stratagene

2.1.6.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
AH109	MATa, <i>trp1</i> -901, <i>leu2</i> -3, 112, <i>ura3</i> -52 <i>bis3</i> -200, <i>gal4</i> Δ, <i>gal80</i> Δ, LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> - GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> - ADE2, URA3::MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> - lacZ, MEL1	Clontech, Heidelberg
T7/ <i>Pf tlp1</i> tail1/2	MATa, isogen zu AH109 ( <i>tlp1</i> tail1/2xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pf tlp1</i> tail1/3	MATa, isogen zu AH109 ( <i>tlp1</i> tail1/3xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pb myoA</i>	MATa, isogen zu AH109 ( <i>myoA</i> xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pf ama1</i> tail	MATa, isogen zu AH109 ( <i>ama1</i> tailxpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pb trap</i> tail	MATa, isogen zu AH109 ( <i>trap</i> tailxpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pf trap</i> tail1	MATa, isogen zu AH109 ( <i>trap</i> tail1xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pf trap</i> tail2	MATa, isogen zu AH109 ( <i>trap</i> tail2xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pf trap</i> tail3	MATa, isogen zu AH109 ( <i>trap</i> tail3xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pf trap</i> tail4	MATa, isogen zu AH109 ( <i>trap</i> tail4xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pb aldolase</i>	MATa, isogen zu AH109 ( <i>aldolase</i> xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pf aktin1</i>	MATa, isogen zu AH109 ( <i>aktin1</i> xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pf mcp1</i> -1	MATa, isogen zu AH109 ( <i>mcp1</i> -1xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7/ <i>Pf mcp1</i> -2	MATa, isogen zu AH109 ( <i>mcp1</i> -2xpGBKT7( <i>kan</i> ))	diese Arbeit
T7-Rec/ <i>Pb aldolase</i>	MATa, isogen zu AH109 ( <i>aldolase</i> xpGADT7-Rec( <i>amp</i> ))	diese Arbeit
T7-Rec/ <i>Pf aktin1</i>	MATa, isogen zu AH109 ( <i>aktin1</i> xpGADT7-Rec( <i>amp</i> ))	diese Arbeit
T7-Rec/ <i>Pf mcp1</i> -1	MATa, isogen zu AH109 ( <i>mcp1</i> -1xpGADT7-Rec( <i>amp</i> ))	diese Arbeit
T7-Rec/ <i>Pf mcp1</i> -2	MATa, isogen zu AH109 ( <i>mcp1</i> -2xpGADT7-Rec( <i>amp</i> ))	diese Arbeit
T7-Rec/ <i>Pb mtip</i>	MATa, isogen zu AH109 ( <i>mtip</i> xpGADT7-Rec( <i>amp</i> ))	diese Arbeit
T7-Rec/ <i>Pf trap</i> tail1	MATa, isogen zu AH109 ( <i>trap</i> tail1xpGADT7-Rec( <i>amp</i> ))	diese Arbeit
T7-Rec/ <i>Pf ama1</i> tail	MATa, isogen zu AH109 ( <i>ama1</i> tailxpGADT7-Rec( <i>amp</i> ))	diese Arbeit
T7-Rec/ <i>Pf trap</i> tail4	MATa, isogen zu AH109 ( <i>trap</i> tail4xpGADT7-Rec( <i>amp</i> ))	diese Arbeit

### 2.1.6.3 Maus- und Ratten-Stämme

- |   |  |
|---|--|
| - Naval Medical Research Institute (NMRI)<br>Auszucht-Mäuse | Charles River Laboratory, Sulzfeld,<br>Deutschland |
| - WIST (Wistar), Auszucht-Ratten                            |  |
| - Sprague-Dawley (SD), Auszucht-Ratten                      |  |

#### Haltung

Die Haltung der Ratten und Mäuse erfolgt in Makrolon-Käfigen. Die Besatzungsdichte liegt in der Regel bei 5 Mäusen bzw. 2 Ratten pro Käfig. Die Käfige stehen in speziellen Tierräumen bei konstanter Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Feuchtigkeit von 50 bis 60%. Der Hell-/Dunkelrhythmus liegt unabhängig von der Jahreszeit täglich bei 12 Stunden.

#### Fütterung

Standard-Futter (Trockenpellets)	SSNIFF
----------------------------------	--------

### 2.1.6.4 Moskito-Stämme

<i>Anopheles stephensi</i>	Nijmegen, Niederlande EMBL, Heidelberg
----------------------------	---

#### Anopheles-Züchtung

Zur Eiproduktion benötigen die weiblichen *Anopheles* Mücken eine Blutmahlzeit. Dazu werden zwei Mäuse oder eine Ratte mit Ketamin/Xylazinhydrochlorid narkotisiert und 15 Minuten auf einen Käfig gelegt, in dem sich zwei bis sieben Tage alte Moskitos befinden. Vier Tage nach der Blutmahlzeit findet die Eiablage statt. Hierzu wird den Moskitos eine mit Aufzuchtswasser gefüllte Petrischale, die mit einem Faltenfilter ausgelegt ist, in die Käfige gestellt. Nach der Ei-Entnahme werden diese über den Faltenfilter im Wechsel zuerst mit Aufzuchtswasser, dann mit 70% Ethanol und abschließend noch mal mit Aufzuchtswasser gewaschen und in eine mit Aufzuchtswasser gefüllte Larvenwanne gegeben. Die geschlüpften Larven werden alle 2 Tage gewaschen und wenn nötig vereinzelt. Die Fütterung mit 1/3 Katzen-Trockenfutter erfolgt täglich. Ab dem neunten Tag der Ei-Entnahme werden die Puppen abgesammelt und zum Schlüpfen in eine Petrischale in einen Moskito-Käfig gegeben.

Die Moskitos werden täglich mit einem in 10% Sucrose-Lösung (mit 0,2µg/ml pABA) und einem in Aufzuchtswasser getränktem Wattebausch gefüttert. Die Haltung der Moskitos erfolgt bei 21°C (Insektarium) bzw. 28°C (Aufzuchtstraum) und 80% Luftfeuchtigkeit, wobei ein

Hell-/Dunkelrhythmus von 14 zu 10 Stunden eingehalten wird.

#### 2.1.6.5 Parasiten-Stämme

<i>Plasmodium berghei</i>	NK65
<i>Plasmodium falciparum</i>	HB3, 3D7

#### 2.1.6.6 Zelllinien

HuH7	Humane Hepatoma Zelllinie
------	---------------------------

#### 2.1.6.7 Vektoren

##### 2.1.6.7.1 *Plasmodium berghei*-Vektoren

In den letzten Jahren wurden einige Transfektionssysteme für *P. berghei* etabliert. Durch die Entwicklung eines stabilen Transfektionssystems wurde es ermöglicht, die Funktion von unbekanntem Proteinen mit Hilfe von Gendelektion sowie einer kompletten Ausschaltung des Gens zu untersuchen. Dazu können verschiedene Plasmide als Vektoren dienen (Waters *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit wurden b3D.DT<sup>H</sup>.<sup>D</sup> (bezogen von A.P. Waters, Universität Leiden, Niederlande) und pSE02 (Frevert *et al.*, 2005) als Vektoren verwendet.

Der Vektor b3D.DT<sup>H</sup>.<sup>D</sup> besitzt den Selektionsmarker Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthetase (*DHFR/TS*) von *Toxoplasma gondii*, dessen Expression von einer voranstehenden 5' nicht-translatierten Sequenz (5'UTR) und einer nachfolgenden 3'UTR gesteuert wird. Die 5'UTR, die den Promotor und den Transkriptionsstartpunkt enthält, sowie die 3'UTR, die die Transkriptionsstoppstelle und die Polyadenylierungsstelle beinhaltet, stammen dabei vom *PbDHFR/TS*-Gen. Der Vektor beinhaltet zusätzlich Sequenzen des pBluescript-Plasmids mit dem  $\beta$ -Lactamase-Gen und verleiht diesem Resistenz gegenüber Ampicillin. Das Plasmid hat die Eigenschaft eines *E. coli/Plasmodium* Shuttle-Vektors.

Das Plasmid pSE02 ist ein Derivat von b3D.DT<sup>H</sup>.<sup>D</sup>. Es enthält zusätzlich zu den oben aufgeführten regulatorischen Elementen eine weitere 3'UTR des *Pb DHFR/TS*-Gens. Diese liegt, durch einen Polylinker getrennt, angrenzend an die 3'UTR des *Tg DHFR/TS* Selektionsmarkers.

##### 2.1.6.7.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Vektoren

pGBKT7	Clontech, Heidelberg
pGADT7-Rec, linearisiert	Clontech, Heidelberg

Beide Vektoren wurden mit dem *BD Matchmaker<sup>TM</sup> Library Construction & Screening Kit* mitgeliefert.



### 2.1.6.7.3 Vektor zur Proteinüberexpression

pGEX-4T-1

Amersham, Freiburg

Mit Hilfe des pGEX-4T-1 Vektors wird das Zielprotein als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusion exprimiert. Hierbei steht die Expression von GST unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors, wodurch eine Induktion durch die Zugabe von Isopropyl-1 thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (IPTG) ins Kulturmedium gewährleistet wird. Die vorliegende Sequenz einer Thrombin-Schnittstelle ermöglicht die Trennung von GST und dem Zielprotein während oder nach der Aufreinigung.

### 2.1.6.7.4 Vektor zur Sequenzierung eines PCR-Fragments

pUC19

Yanisch-Perron C., Vieira J. und Messing J.  
(1985) *Gene*. 33:103-119.

## 2.1.7 Antikörper

### 2.1.7.1 Verwendete primäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen

Antigen	Verdünnung	Quelle
Maus-anti-CSP ( <i>P. berghei</i> )	1:300	Nussenzweig RS, New York
Maus-anti-HSP70	1:1	Tsuji M, New York

### 2.1.7.2 Verwendete sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen

Antigen	Verdünnung	Quelle
Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488	1:300	Molecular Probes, NL

### 2.1.7.3 Verwendete primäre Antikörper für Western-Blot-Analysen

Antigen	Verdünnung	Quelle
Maus-anti-CSP ( <i>P. berghei</i> )	1:5000	Nussenzweig RS, New York
Kaninchen-anti-TRAP (repeat region; <i>P. berghei</i> )	1:3000	Frevert U, New York
Maus-anti-c-myc	1:500	Zytomed GmbH, Berlin
Maus-anti-c-myc	1:2000	Biomol GmbH, Hamburg
Maus-anti-HA	1:500	Zytomed GmbH, Berlin
Maus-anti-GST	1:15000	Roche, Mannheim
Kaninchen-anti-TLP1 Serum (charged region; <i>P. berghei</i> )	1:10000	diese Arbeit; Eurogentec, Belgien
Kaninchen-anti-TLP1 Prä- Immuns serum	1:5000	
Kaninchen-anti-Aktin	1:2000	Sigma, Taufkirchen
Ratte-anti-AMA1	1:5000	Thomas A, Rijswijk

### 2.1.7.4 Verwendete sekundäre Antikörper für Western-Blot-Analysen

Antigen	Verdünnung	Quelle
Anti-Maus IgG-HRP	1:2000/1:5000	Sigma, Taufkirchen
Anti-Kaninchen IgG-HRP	1:5000	Sigma, Taufkirchen
Anti-Ratte IgG-HRP	1:10000	Dianova, Hamburg

### 2.1.8 Enzyme

#### 2.1.8.1 Molekularbiologisches Arbeiten

Alle Restriktionsenzyme wurden von NEB (Frankfurt) bezogen.

T4-DNA-Ligase

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

*Taq* DNA-Polymerase (5U/μl)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.8.2 Biochemisches Arbeiten

Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Thrombin (1U/ $\mu$ l)	Amersham, Freiburg

### 2.1.9 Kits

Bulk GST Purification Module	Amersham, Freiburg
QIAgen PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAgen Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp DNA-Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
BD Matchmaker <sup>TM</sup> Library Construction & Screening Kit	Clontech, Heidelberg/ BD Bioscience
Micro-FastTrack 2.0 Kit (mRNA)	Invitrogen, Karlsruhe
RETROscript cDNA Synthese Kit	Ambion
Turbo DNA-free <sup>TM</sup> Kit	Ambion

### 2.1.10 Oligonukleotide

Die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind in Klammern angegeben bzw. unterstrichen.

Alle verwendeten Oligonukleotide für Sequenzierungen und PCR-Amplifikationen wurden von Invitrogen Custom Primers, Karlsruhe bezogen.

<i>Pb tlp1zwfor</i> ( <i>Bam</i> HI)	5' <u>CGGGATCCT</u> AGGTGGT <sup>T</sup> TCTACTAAGG 3'
<i>Pb tlp1zwrev</i> ( <i>Xba</i> I)	5' <u>CTCTAGA</u> TTCGTTCAT <sup>T</sup> TTGTTCGACC 3'
<i>Pb tlp1for1</i> ( <i>Bam</i> HI)	5' <u>CGCGGATCC</u> CTATTTGATAATATCGATACAGAC CC 3')
<i>Pb tlp1rev2</i> ( <i>Xba</i> I)	5' TG <u>CTCTAGA</u> AAATCTATATCCT <sup>T</sup> TTTGTTCATCC AC 3'
<i>Pb tlp1for3</i> ( <i>Xba</i> I)	5' TG <u>CTCTAGA</u> TAAGCCAAATATTTCAAACAGC AC 3'
<i>Pb tlp1rev4</i> ( <i>Sac</i> II)	5' <u>TCCCCGCGG</u> TCAGATATCATGAATTCTTCCG GG 3'
<i>Pb tlp1test1rev</i> ( <i>Sac</i> II)	5' <u>TCCCCGCGG</u> TATGGATCCATCAGGTCAAATG CC 3'

<i>Pb tlp1</i> test2rev ( <i>SacII</i> )	5' <u>TCCCCGCGGA</u> ACATCCATATTAATAACAT CG 3'
<i>Pb mcp1</i> for	5' CGCGGATCCATTTTAAAGACTTTGGATAAAA TG 3'
<i>Pb mcp1</i> rev	5' GGGAATTCATATGCCITTCAGAAGATTTCGT ACTTTTCCC 3'
<i>Pf tlp1</i> exp for	5' AAGGAAGAAGATAATATTCCTCG 3'
<i>Pf tlp1</i> exp rev	5' TACCGGGGTAGATTATTATCACG 3'
<i>Pf msp7</i> Nter22	5' GCGCATCGATATCGAAGGTCGTAGTGAAACAG ATAC 3'
<i>Pf msp7</i> DPstC-ter	5' GCGCTGCAGTTACATTGTGTTTAGTAAATTA AATG 3'
<i>Pf ama1</i> -66Cla	5' CCATCGATATTGAAATAGTAGAAAGAAG 3'
<i>Pf ama1</i> -D2Pst	5' GGTTCTGCAGTTAATGGGACAAAGCAGTAGTA GC 3'
<i>Pb trapD</i> 5' for ( <i>EcoRI</i> )	5' <u>CGGAATTCCT</u> TAATGGTCAGGAAATTCCTGA CG 3'
<i>Pb trapD</i> 5' rev ( <i>XbaI</i> ; <i>BamHI</i> )	5' TGCTCTAGATTAGGATCCTGCTATAAAAATTATA ACCAACACC 3'
<i>Pf trap</i> for ( <i>BamHI</i> )	5' <u>CGGGATCCGC</u> CAGCAACACCCTATGCCGGAGAA CC 3'
<i>Pf trap</i> rev ( <i>XbaI</i> )	5' TGCTCTAGATTAATTCCTACTCGTTTCTTCA GG 3'
<i>Pb tlp1</i> for ( <i>BamHI</i> )	5' <u>CGGGATCC</u> AAAAACAAACAAATAATCCAACTA GC 3'
<i>Pb tlp1</i> rev ( <i>XbaI</i> )	5' TGCTCTAGATCATTCCATGGAGAATTGTCATT ATAATC 3'
<i>Pf ama1</i> for ( <i>BamHI</i> )	5' <u>CGGGATCC</u> CAGAAAAGGAAATGCTGAAAAATA TG 3'
<i>Pf ama1</i> rev ( <i>XbaI</i> )	5' TGCTCTAGATTAATAGTATGGTTTTCATC AG 3'
<i>Pb trap</i> for ( <i>BamHI</i> )	5' <u>CGGGATCC</u> GGAAGTAGCGCTGCAGCAATG GC 3'

<i>Pb traprev</i> ( <i>XbaI</i> )	5' TGCTCTAGATTAGTTCCAGTCATTATCTTCA GG 3'
<i>Pb TRAP</i> for	5' CCCGGATCCATGAAGCTCTTAGGAAATAG 3'
<i>Pb TRAP</i> rev	5' CCCGGATCCGTTCCAGTCATTATCTTC 3'
<i>Pb TRAP</i> test for	5' CATAATTGCAAACGCATAGACATG 3'
<i>Pb TRAP</i> test rev	5' AAAGACAAACGAGTTTATGAG 3'
<i>T. gondii</i> DHFR/TS for	5' CCCGCACGGACGAATCCAGATGG 3'
T7 rev	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
amber4 rev ( <i>Pb</i> TRAP)	5' GTGTGGATCCTTCCTGACAAACTTTAGAAAG 3'
<i>Pf tlp1y2h</i> for1 ( <i>EcoRI</i> )	5' CCGGAATTC AATAATAGAAAAGGTAACAAA ATTG 3'
<i>Pf tlp1y2h</i> rev2 ( <i>BamHI</i> )	5' CGCGGATCCTTATTTCCACTGCGTGTCATTC 3'
<i>Pf tlp1y2h</i> rev3 ( <i>BamHI</i> )	5' CGCGGATCCTTACTCCTTAGAAGATGTTTCCT TC 3'
<i>Pb aldo</i> for ( <i>EcoRI</i> )	5' CCGGAATTCATGAAACTTCCAAAAGAAGTT GCCC 3'
<i>Pb aldo</i> rev ( <i>BamHI</i> )	5' CGGGATCCTCATGAGGCACCAGCAGTGCTT CCTCCTGC 3'
<i>Pf act1</i> for ( <i>EcoRI</i> )	5' CCGGAATTCATGGGAGAAGAAGATGTTCAA GC 3'
<i>Pf act1</i> rev ( <i>BamHI</i> )	5' CGCGGATCCTTAGAAACATTTTCTGTGGACAA TAC 3'
<i>Pf mcp1</i> for ( <i>EcoRI</i> )	5' CCGGAATTC AAAAAATGGCTCAATTAGCAG 3'
<i>Pf mcp1</i> rev1 ( <i>BamHI</i> )	5'CGCGGATCCTTAAAAGTTTAAAACCTTGGGT TGCTGAC 3'
<i>Pf mcp1</i> rev2 ( <i>BamHI</i> )	5'CGCGGATCCTTATTTT'TTTTIGT'TGGCT'TGTTC TTT'TTT'TTGTC 3'
<i>Pb myo.A</i> for ( <i>EcoRI</i> )	5' CCGGAATTCGAAAACCTCTGCACCTTGATAGTAG AG 3'
<i>Pb myo.A</i> rev ( <i>BamHI</i> )	5' CGCGGATCCTTAAGCAACCATTCTCTTCTTAT ATG 3'
<i>Pb mtip</i> for ( <i>EcoRI</i> )	5' CCGGAATTCATGGAACAACAATGCCATATG TG 3'

<i>Pb mip</i> rev ( <i>Bam</i> HI)	5' CGCGGATCCTTATTGCAATATATCCTCGC 3'
<i>Pb trap</i> tail Y2H for ( <i>Eco</i> RI)	5' CCGGAATTCATAGCAGGAAGTAGCGCTGCA GC 3'
<i>Pb trap</i> tail Y2H rev ( <i>Bam</i> HI)	5' CGCGGATCCTTAGTTTTCAACAATACCCTTTTC ATC 3'
<i>Pf ama1</i> for ( <i>Eco</i> RI)	5' CCGGAATTCATATAAAAGAAAAGGAAATGC TG 3'
<i>Pf ama1</i> rev ( <i>Bam</i> HI)	5' CGCGGATCCCTATGGTTTTTCCATCAGAACT GG 3'
<i>Pf trap</i> CTD for ( <i>Eco</i> RI)	5' CCGGAATTCATATAAATTCGTAGTACCAGGAGC AGC 3'
<i>Pf trap</i> CTD rev ( <i>Bam</i> HI)	5' CGCGGATCCTTAATTCCACTCGTTTTCTTCA GG 3'
<i>Pf trap</i> delta rev ( <i>Bam</i> HI)	5' CGCGGATCCTTAAGGTTTCGTCCAAATCTTTATC TTC 3'
<i>Pf trap</i> CTD for-y ( <i>Eco</i> RI)	5' CCGGAATTCGTAGTACCAGGAGCAGCAACAC CC 3'
<i>Pb tlp1</i> overexp for ( <i>Eco</i> RI)	5' CGGAATTC AACAAATCAGAAAATCTGATCGTT CC 3'
<i>Pb tlp1</i> overexp rev1 ( <i>Not</i> I)	5' ATAAGAATGCGGCCGCTAATCTATATCCTTTTT GTCATCC 3'
<i>Pb tlp1</i> overexp rev2 ( <i>Not</i> I)	5' ATAAGAATGCGGCCGCTCAATACCITTTATTATT TCTATGC 3'
Sequenzierungsoligonukleotide	
Khseq	5' AGTCTAAATCTAATAACGGATATA 3'
DNAbd	5' TAAGAGTCACTTTAAAATTTGTAT 3'
DNAad	5' AGATGGTGCACGATGCACAG 3'

### 2.1.11 DNA-Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma gatc-Biotech, Konstanz durchgeführt: Single-Read Sequenzierung mit Standardprimern oder Kundenprimern.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultur und Transformation prokaryontischer Zellen

##### 2.2.1.1.1 Flüssigkulturen von *E. coli*-Bakterien

Für *E. coli*-Flüssigkulturen wurden 4ml bzw. 250ml Nährmedium (LB-Medium) mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion, mit Bakterienzellen inokuliert und über Nacht bei 230rpm und 37°C inkubiert. Bei den Bakterien handelte es sich um Zellen einer Vorkultur (100-200µl), Zellen direkt von einer auf Agarplatte gewachsenen Zellkolonie oder um eine Glycerin-Bakterienstammlösung.

##### 2.2.1.1.2 Plattenkulturen

Plattenkulturen dienen zum Wachstum einzelner Bakterienkolonien. Dazu wurden die Bakterien mithilfe einer sterilen Impföse auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotika enthielten, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die anschließende Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C. Unter diesen Bedingungen sind die Platten bis zu vier Wochen haltbar.

##### 2.2.1.1.3 Herstellung einer Bakterien-Dauerkultur

Ausgehend von einer auf Agarplatte gewachsenen Bakterienkultur wurde eine Flüssigkultur mit entsprechendem Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Zu 500µl Bakteriensuspension wurden 500µl 30% Glycerin-Lösung gegeben und gut gemischt. Diese Bakterienstammlösung kann bei -80°C für mehr als 2 Jahre gelagert werden.

##### 2.2.1.1.4 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Bei der Transformation kompetenter Bakterienzellen wird fremde DNA aufgenommen, wodurch nachfolgend die eingeführten Gene exprimiert werden. Unter diesen Genen befinden sich in der Regel Resistenz-Marker für Antibiotika, wodurch die Aufnahme der DNA durch Kultivierung in bzw. auf entsprechendem Medium kontrolliert werden kann. Bakterien die fähig sind, Fremd-DNA aufzunehmen, nennt man kompetent.

In dieser Arbeit wurden zur Transformation von Ligations-Ansätzen und Vektoren *E. coli* XL-1 Blue kompetente Zellen (Stratagene) verwendet. Dazu wurden diese langsam auf Eis aufgetaut und anschließend in ein vorgekühltes 15ml Falcon-Gefäß aliquotiert. Es wurden pro Transformationsansatz 40µl Zellen eingesetzt. Vor der Zugabe des Ligationsansatzes (2µl) bzw. der verdünnten Plasmid-DNA (1µl), wurden die Zellen 10 Minuten mit β-Mercaptoethanol

permeabilisiert. Zusammen mit der DNA wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert. Auf den anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden folgte eine Abkühlung für 2 Minuten auf Eis. Diese Behandlung induziert einen transienten Zustand der Kompetenz in *E. coli*, d.h., dass die Bakterien nun fähig sind, fremde DNA aufzunehmen.

Danach wurden die transformierten Zellen in 900µl vorgewärmten LB-Medium aufgenommen und für 1 Stunde im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. 200µl des Transformationsansatzes wurden anschließend auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 16-20 Stunden sollten sich mehrere Bakterienkolonien auf der Agarplatte befinden.

Für die Transformation von Plasmiden zur Proteinüberexpression wurden *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL-Zellen (Stratagene) bzw. BL21-CodonPlus-RIPL-Zellen (Stratagene) verwendet. Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurden diese, wie oben beschrieben, in ein vorgekühltes 15ml Falcon-Gefäß aliquotiert. Es wurden von den RIL-Zellen 40µl bzw. von den RIPL-Zellen 20µl pro Transformationsansatz verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit 1:10 verdünntem XL10Gold β-Mercaptoethanol für 10 Minuten auf Eis permeabilisiert. Nach der Zugabe der verdünnten (1:5 bzw. 1:100) Plasmid-DNA (1µl) folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 20 Sekunden. Nach der Abkühlung des Transformationsansatzes für 2 Minuten auf Eis wurden die Zellen in 900µl vorgewärmten LB-Medium aufgenommen und 1 Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden 600µl des Transformationsansatzes auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotika (Ampicillin bei RIPL-Zellen bzw. Chloramphenicol, Tetracyclin und Ampicillin bei RIL-Zellen) ausplattiert und die Platte so lange stehen gelassen, bis keine Flüssigkeit mehr auf der Oberfläche zu sehen war. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.2.1 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

##### 2.2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Je nach benötigter DNA-Quantität und Qualität werden unterschiedliche Verfahren zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen angewandt, die jedoch auf gleichen Prinzipien beruhen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren. Eine am häufigsten angewandte Methode ist die alkalische Lyse, bei der die Bakterien durch Natriumhydroxid und Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert werden. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe von Natriumacetat, wobei bakterielle Bestandteile wie Lipide, Proteine und die bakterielle DNA ausfallen. Der geschlossene helikale Doppelstrang-Ring der Plasmid-DNA



bleibt nach der Neutralisation im Überstand gelöst, da die ineinander verschlungenen komplementären Plasmid-Ringe, im Gegensatz zu der linearen bakteriellen DNA, lokal konzentriert bleiben. Sie können nach der Neutralisation wieder leicht miteinander hybridisieren. In dieser Arbeit wurden die Reagenzien des *QIAgen Spin Miniprep Kit* und des *HiSpeed Plasmid Maxi Kits* von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers bzw. nach Angaben des Protokolls.

### 2.2.2.1.2 Alkoholfällung von DNA

Bei der Alkoholfällung wird ausgenutzt, dass gelöste DNA, nachdem die Lösung mit einem einfach geladenen Salz (Natriumacetat pH 4,8) versetzt wurde, durch Zugabe von Alkohol (Ethanol) spontan ausfällt. Diese Methode wird benutzt, um z.B. DNA anzureichern oder um DNA-Lösungen zu reinigen, da Salze und andere wasserlösliche Substanzen gelöst bleiben und nicht ausfallen. Dabei sollte die Natriumacetatkonzentration vor der Zugabe des Alkohols 0,3M in der DNA-Lösung betragen und zur Fällung das 2,5-fache Volumen der zu präzipitierenden Lösung an Ethanol zugegeben werden.

Die Fällung erfolgte bei -80°C für mindestens 30 Minuten bzw. bei -20°C über Nacht. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation sedimentiert (13200rpm, 4°C, 20 Minuten) und, um die Lösung von restlichen Salz- und Alkoholresten zu reinigen, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das benötigte Waschvolumen entspricht dabei dem zuvor verwendeten Fällungsvolumen des absoluten Ethanols.

Nach Trocknen des Niederschlags bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten wurde dieser in entsprechendem Puffer und Volumen aufgenommen.

### 2.2.2.1.3 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren basiert auf deren Absorptionsmaximum bei 260nm. Für die Absorption ( $A$ ) sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Bei Proteinen liegt das Absorptionsmaximum bei 280nm, beruhend auf den aromatischen Aminosäureresten.

Die Konzentration der DNA ergibt sich wie folgt:

$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g/ml}$  ( $A_{260} = 1$  entspricht 50  $\mu\text{g}$  DNA/ml). Bei RNA entspricht eine Absorption bei 260nm von 1 einer Konzentration von 40  $\mu\text{g}$  RNA/ml.

Die Bildung des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  ermöglicht eine Aussage über die Reinheit der DNA-Lösung. Bei einer proteinfreien Nukleinsäure-Lösung liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0. Je kleiner der Wert ist, desto stärker verunreinigt ist die DNA-Lösung.

### 2.2.2.1.4 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook, 1989) wird zur Charakterisierung und Aufreinigung von doppelsträngiger DNA eingesetzt.

Die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren bewegen sich im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Masse (konstantes Ladungs- zu Massenverhältnis) und der Form der Nukleinsäuren. Agarosegele erlauben die Auftrennung von einigen 100 bis mehreren 1000bp abhängig von der Agarose-Konzentration. Durch den Farbstoff Ethidiumbromid, der in doppelsträngige DNA interkaliert und mit UV-Licht (302nm) angeregt werden kann, ist es möglich, die DNA sichtbar zu machen. Die Emission liegt im orange-roten Bereich (590nm).

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte unter der Verwendung von 1,0-2,0%-igen Agarosegelen in 1x TAE-Elektrophoresepuffer. Den Gelen wurde nach Aufkochen der Agarose in 1x TAE-Puffer und anschließendem Abkühlen auf zirka 60°C Ethidiumbromid (5µg/100ml) zugesetzt. Als Größenstandard diente ein 1kb-Molekulargewichtsmarker (Fermentas). Die Proben wurden vor dem Laden des Gels mit 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt. Je nach Elektrophoresekammer erfolgte die Auftrennung bei 60-90V für 30-60 Minuten.

### 2.2.2.1.5 Sequenzierung

Um Plasmid-DNA auf Mutationen zu überprüfen, muss sie sequenziert werden.

Dafür wurde die Plasmid-DNA mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* isoliert und bei einem kommerziellen Sequenzier-Service (gatac-biotech, Konstanz) mit den entsprechenden Oligonukleotiden sequenziert.

Ebenso wurden die erhaltenen Plasmid-DNA-Sequenzen aus dem *Yeast-two-hybrid screening* mit dem T7-Standardprimer sequenziert.

### 2.2.2.1.6 Computergestützte Sequenzanalysen

Datenbankvergleiche mit bekannten Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus am NCBI (National Center for Biotechnology Information), PlasmoDB, TIGR und dem Sanger Institut über das World Wide Web durchgeführt.

### 2.2.2.2 *In vitro*-Modifikation und Rekombination von DNA

#### 2.2.2.2.1 DNA-Restriktion

Restriktionsendonukleasen erkennen sequenzspezifisch doppelsträngige DNA. Diese Erkennungssequenzen sind meist palindromisch und umfassen in der Regel vier bis sechs Basenpaare. Die Enzyme spalten die DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen, wobei je nach Enzym *blunt ends* (glatte Enden) oder *sticky ends* (überhängende Enden) entstehen. Somit kann zirkuläre DNA linearisiert oder spezifische Bereiche ausgeschnitten werden. Die Enzymeinheit wird in *Units* (U) angegeben, wobei eine *Unit* der Enzymmenge entspricht, die benötigt wird, um 1 µg λ-Phagen-DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde zu schneiden.

Zur Restriktion von Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragmenten wurden Ansätze mit 20-100 µl Gesamtvolumen verwendet. Dabei wurden pro µg DNA mindestens eine Enzymeinheit eingesetzt und im entsprechenden Reaktionspuffer (nach Herstellerangaben) für zirka 2 Stunden oder über Nacht bei 37°C bzw. der für das Enzym angegebenen Reaktionstemperatur inkubiert. Der Volumenanteil an Puffer und 10x BSA (Zusatz abhängig vom Enzym) wird auf zirka 1/10 des Gesamtvolumens gehalten. Die DNA bzw. das DNA-Fragment konnte mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten werden, wenn beide Enzyme unter gleichen Bedingungen ihre optimale Aktivität zeigten. Der Volumenanteil der Enzyme am gesamten Restriktionsansatz sollte nicht 10% überschreiten, da ansonsten das in den Enzymen enthaltene Glycerin unspezifisches Restringieren hervorrufen könnte.

Nach erfolgter Inkubation wurde ein Aliquot oder der gesamte Ansatz mit Probenpuffer versetzt und mit Hilfe eines Agarosegels analysiert bzw. zur weiteren Verwendung mit dem *QIAgen PCR Purification Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

#### 2.2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) kann aus geringen Mengen DNA bzw. cDNA ein spezifisches Fragment amplifiziert werden. Dabei wird die Matrize (*template*) zunächst durch Hitze denaturiert. Durch die darauffolgende Temperaturerniedrigung hybridisieren spezifische Oligonukleotide (*Primer*) an die einzelsträngige Matrizen-DNA (*Annealing*), die durch die *Taq*-DNA-Polymerase nach Erhöhung der Temperatur verlängert werden (*Elongation*). Wiederholte Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation führen zur Anreicherung eines doppelsträngigen DNA-Fragments ( $2^N$ ; N= Anzahl der Zyklen).

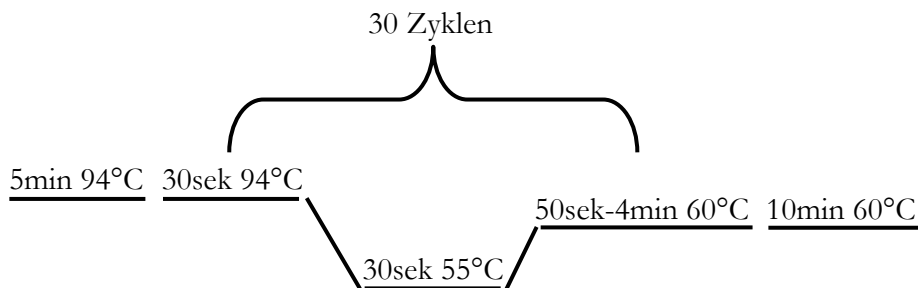
Die verwendeten Oligonukleotide können dabei überhängende Enden besitzen, so dass das amplifizierte DNA-Fragment anschließend mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und in einen Vektor kloniert werden kann.

Es wurde folgender Ansatz gewählt:

<i>Template</i> -DNA	0,5-2,0µl
Primer 1 (100µM)	0,5µl
Primer 2 (100µM)	0,5µl
10x PCR-Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4µl
dNTPs (2mM)	5µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,5µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50µl

Die verwendeten Oligonukleotide sind im Materialien-Abschnitt zusammengefasst.

Es wurde folgendes Standard-PCR-Programm gewählt:



Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotiden. Diese lässt sich für jedes Oligonukleotid aus dessen GC/AT-Gehalt und der Länge nach folgender Formel errechnen:

$$T_m = 59,9 + 41 [\%GC] - [675/\text{Länge des Oligonukleotids}]$$

Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments, wobei mit 1kb pro Minute kalkuliert wird. Mit dem letzten Schritt bei 60°C für 10 Minuten wird die Reaktion abgeschlossen.

Das Ergebnis der PCR wurde in einem analytischen Agarosegel untersucht. Amplifizierte DNA-Fragmente, die für Klonierungen verwendet wurden, wurden mit dem *QIAgen PCR Purification Kit*

nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt, um die überschüssigen Oligonukleotide und Proteine zu entfernen.

### 2.2.2.2.3 Ligationen

Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert in Anwesenheit von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA. Eine Einheit des Enzyms (1 *Unit*) ist definiert als die Ligasemenge, die notwendig ist, um die Konversion von 1nmol  $^{32}\text{P}_i$  in ATP bei 37°C in 20 Minuten zu katalysieren.

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 10µl durchgeführt. Pro Ansatz wurden 100-200ng Vektor-DNA und die 4-5 fache Molarität an Insert-DNA eingesetzt. Des Weiteren wurden 1µl des vom Hersteller (Fermentas) mitgelieferten 10x Ligasepuffers und eine *Unit* T4-DNA-Ligase zugegeben. Das Endvolumen wurde mit sterilem Wasser eingestellt. Der Ligationsansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in kompetente Bakterienzellen transformiert.

### 2.2.2.3 Isolierung und Analyse von RNA

#### 2.2.2.3.1 mRNA-Isolierung

Für die Expressionsanalyse bestimmter Gene wurde mRNA aus verschiedenen Stadien sowohl von *Plasmodium berghei* als auch von *Plasmodium falciparum* mit Hilfe von Oligo(dT)-Säulen isoliert. Hierfür wurden die Reagenzien des *Micro-FastTrack 2.0 Kit* (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet.

Die isolierte mRNA wurde mindestens für 2 Stunden oder über Nacht bei -80°C präzipitiert und anschließend bei 13200rpm für 20 Minuten (4°C) zentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag wurde je nach weiterer Anwendung in 8µl bzw. für einen anschließenden DNase-Verdau in 18µl Elutionspuffer resuspendiert.

Die Lagerung der mRNA erfolgte bei -80°C.

#### 2.2.2.3.2 DNaseI-Verdau der isolierten mRNA-Präparation

Um eventuell vorhandene Verunreinigungen der RNA-Präparation mit genomischer DNA zu entfernen, wurde ein Verdau mit DNaseI (*Turbo DNA-free Kit*, Ambion) durchgeführt.

Dazu wurde der in 18µl Elutionspuffer resuspendierten mRNA 2µl 10x DNaseI-Puffer (0,1 Volumen) und 1µl DNaseI zugesetzt und bei 37°C für 15 Minuten im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die mRNA mittels einer Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt. Dazu

wurde dem Ansatz 150µl H<sub>2</sub>O, 15µl 5M Ammoniumacetat zum Abstoppen der Reaktion bzw. für die darauffolgende Fällung und 150µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und auf dem Vortex-Schüttler kurz gemischt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C wurde die obere, wässrige Chloroformphase (RNA-Phase) in ein neues 1,5ml Eppendorf-Gefäß (RNase frei) überführt. Um restliches Phenol zu entfernen wurde die abgenommene Phase mit einem Volumen Chloroform versetzt und gevortext. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert und die dadurch erhaltene obere Phase abgenommen. Es folgte die Präzipitation der mRNA durch die Zugabe von 110µl Isopropanol. Das notwendige Salz für die Fällung wurde bereits in Form des 5M Ammoniumacetats zugegeben. Das Gemisch wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 13200rpm für 20 Minuten (4°C) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 75% Ethanol gewaschen, für 5-10 Minuten luftgetrocknet und in 20µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.2.2.3.3 Reverse Transkription (RT) von mRNA zu einem RNA/DNA-Hybrid

Bei der reversen Transkription wird die mRNA in komplementäre DNA-Moleküle (cDNA) übersetzt. Die Synthese des DNA-Stranges wird durch das, aus Retroviren stammende, Enzym Reverse Transkriptase bewerkstelligt. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Mit Hilfe von *random* oder Oligo(dT)-Primern wird dabei die mRNA in cDNA umgeschrieben.

In dieser Arbeit wurde für die Synthese von cDNA der *RETROscript cDNA Synthese Kit* von Ambion verwendet. Um die mRNA auf DNA-Kontaminationen zu testen, wurde bei jeder Reaktion eine Minus-RT-Kontrolle durchgeführt. In diesem Ansatz sind mit Ausnahme der Reversen Transkriptase alle Reagenzien enthalten. Dieser Ansatz gibt bei der sich anschließenden PCR Aufschluss darüber, ob genomische DNA oder cDNA als Matrize fungierte.

Für die cDNA-Synthese wurde folgender Ansatz gemacht:

4µl bzw. 10µl mRNA  
2µl *random* bzw. Oligo(dT)-Primer  
xµl nuklease-freies H<sub>2</sub>O  

---

Σ 12µl

Um eventuell vorhandene Sekundärstrukturen der mRNA zu denaturieren, wurde dieser Ansatz für 3 Minuten bei 85°C in der PCR-Maschine inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde dem Ansatz folgendes zugegeben:

2µl 10x Reverse Transkriptase-Puffer  
4µl dNTPs  
1µl RNase-Inhibitor  
1µl Reverse Transkriptase bzw. ddH<sub>2</sub>O (-RT-Ansatz).

Die Synthese der cDNA erfolgte bei 42°C für 1 Stunde (PCR-Maschine). Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Gemisch auf 92°C für 10 Minuten erhitzt. Dieser Schritt inaktiviert die Reverse Transkriptase. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -80°C.  
Im Anschluss wurde die cDNA mittels PCR analysiert.

### **2.2.3 *Plasmodium berghei*-Methoden**

#### **2.2.3.1 Mikroskopische Darstellung von *P. berghei* mittels Giemsa-Färbung und Bestimmung der Parasitämie**

Zur Untersuchung der einzelnen Parasitenstadien und zur Bestimmung der Parasitämie wird ein Blutausstrich gemacht, der anschließend mit Giemsa gefärbt wird.

Der Maus/Ratte wurde dazu durch Schwanzpunktion mit einer Kanüle ein Tropfen Blut entnommen. Dieser Tropfen wurde auf einen Objektträger gegeben und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Nach Trocknen des Ausstrichs wurde dieser in Methanol fixiert und anschließend in frisch angesetzter Giemsa-Lösung (1:10 in VE-Wasser) für 10-15 Minuten gefärbt. Das überschüssige Giemsa wurde mit VE-Wasser von den Ausstrichen abgespült und diese dann getrocknet. Bei 100-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv erfolgte im Anschluss die Analyse am Lichtmikroskop.

Die Parasitämie gibt die prozentuale Anzahl *Plasmodium*-infizierter Erythrozyten an. Zur Bestimmung der Parasitämie wird ein Bereich im Blutausstrich gewählt, in dem die Erythrozyten in einlagiger Schicht vorliegen.

Es wurden in mindestens zehn nebeneinander liegenden Sichtfeldern die Anzahl der gesamten Erythrozyten (infiziert und nicht infiziert) und der Parasiten ausgezählt. Mehrfachinfektionen, wenn vorhanden, wurden einfach gezählt bzw. Gametozyten wurden nicht mit einberechnet.

Die Parasitämie errechnet sich wie folgt:

$$(\text{Anzahl Parasiten} / \text{Anzahl Erythrozyten}) \times 100 = \text{Parasitämie in \%}$$

#### **2.2.3.2 Untersuchung der Exflagellation von *P. berghei*-Gametozyten**

Zur Infektion der *Anopheles*-Moskitos mit *P. berghei* muss sichergestellt werden, dass die männlichen Gametozyten im Blut einer mit *P. berghei*-infizierten Maus ausreichend exflagellieren.

Normalerweise findet die Exflagellation, d.h. die Differenzierung des Mikrogamonten in vier bis acht Mikrogameten, im Darm des Moskitos statt. Die Exflagellation kann unter anderem durch einen Temperaturabfall von 2-5°C induziert werden (Sinden und Croll, 1975). Diese Eigenschaft wird *in vitro* ausgenutzt, indem die Parasiten aus dem Blut einer Maus von 37°C auf Raumtemperatur gebracht werden.

Zur Untersuchung der Exflagellation wurde einer Maus durch Schwanzpunktion ein Tropfen Blut entnommen, dieser auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach zirka zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden die Parasiten bei 40-facher Vergrößerung auf Exflagellation überprüft. Das Tier wurde für eine Blutmahlzeit verwendet, wenn pro Gesichtsfeld durchschnittlich 3-6 exflagellierende Mikrogamonten zu sehen waren.

### 2.2.3.3 Transfektion von *Plasmodium berghei*

*Gene targeting* ist eine in den letzten Jahren häufig angewendete Methode, um Genfunktionen näher *in vivo* zu untersuchen. Dabei können bestimmte Gene durch gezielte homologe Rekombination verändert oder komplett ausgeschaltet werden. Die Technik wird sowohl in *Plasmodium falciparum* als auch in *Plasmodium berghei* erfolgreich eingesetzt. In beiden Fällen werden die Blutstadien der Parasiten durch Elektroporation transformiert und die Transfektionsvektoren durch homologe Rekombination integriert. Da *Plasmodium* während des Großteils des Lebenszyklus haploid ist, kann die Funktion eines Proteins, das von einem *single-copy gene* kodiert wird, mit nur einem Selektionsmarker untersucht werden.

Der am häufigsten eingesetzte Selektionsmarker ist das bifunktionale *DHFR/TS*-Gen (Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthetase), welches von *P. falciparum*, *P. berghei* oder *Toxoplasma gondii* abgeleitet wurde (van Dijk *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996). Durch eine Punktmutation an Position 110 (Ser → Asn) verleiht *DHFR/TS* Resistenz gegenüber Pyrimethamin. Ein weiterer Selektionsmarker ist die humane Dihydrofolat-Reduktase (*hDHFR*), welche sowohl Resistenz gegenüber dem Antifolat WR99210 als auch Pyrimethamin verleiht (de Koning-Ward *et al.*, 2000). Die Dihydrofolat-Reduktase katalysiert die Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat, einem Koenzym für die *de novo* Nukleotid-Synthese. WR99210 inhibiert die endogene DHFR des Parasiten, hat aber auf die humane Form des Enzyms keine Wirkung, sodass Parasiten mit der humanen Dihydrofolat-Reduktase resistent gegen WR99210 sind.

Der Vorteil des *hDHFR*- bzw. *DHFR/TS*-Gens von *T. gondii* ist, dass unerwünschte Rekombinationen mit dem endogenen *P. berghei* *DHFR/TS*-Gens vermieden werden. Desweiteren scheinen *P. berghei*-Parasiten, die das *T. gondii* *DHFR/TS*-Gen enthalten, 10 bis 100



mal resistenter gegenüber Pyrimethamin zu sein als Parasiten mit dem *P. berghei* DHFR/TS-Konstrukt (van der Wel *et al.*, 1997). Das Selektionsgen wird von zwei Kontrollelementen flankiert. Die 5'-Region enthält den Promotor und die 5'-nicht translatierte Sequenz, die 3'-Region beinhaltet die 3'-nicht translatierte Sequenz und das Stoppsignal (Waters *et al.*, 1997; Thathy und Menard, 2002).

### **2.2.3.3.1 Präparation der Parasiten und *in vitro*-Kultivierung der Erythrozyten-Stadien für die Transfektion**

Parasiten des Pyrimethamin-sensitiven *P. berghei*-Stamm NK65 wurden intraperitoneal in 100-150g schwere WISTAR-Ratten injiziert. Die Parasitämie wurde mit Hilfe von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen verfolgt. Diese sollte drei bis vier Tage nach der Injektion zwischen 1 und 3% liegen. Das Blut der Ratte wurde dann durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommen und zu 10ml vorgewärmten (37°C) Kulturmedium, das mit 0,25ml Heparinlösung in PBS (200U/ml) versetzt wurde, gegeben. Durch die anschließende Zentrifugation bei 1000rpm für 8 Minuten (Raumtemperatur) wurden die Erythrozyten sedimentiert. Dieses Sediment wurde an der Sterilbank mit 50ml Kulturmedium resuspendiert und in einen Erlenmeyerkolben überführt, in dem bereits 100ml vorgewärmtes Kulturmedium vorgelegt wurden. Die Kultur wurde in einem Inkubator mit einem Gasgemisch von 10% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub> bei 37°C über Nacht für 16-18 Stunden bei 77-80rpm vorsichtig geschüttelt. Während dieser Zeit reifen die meisten Parasiten zu Schizonten. Da die Schizonten in der *in vitro* Kultur keine invasiven Merozoiten bilden, wird die Parasitenpopulation synchronisiert.

Am nächsten Tag sollte die Übernachtskultur ein hohes Schizonten/Gametozyten-Verhältnis aufweisen.

### **2.2.3.3.2 Vorbereitung des Transfektionsvektors**

Für eine *P. berghei*-Transfektion wurden 60 bis 70µg der durch Maxi-Präparation gewonnenen Plasmid-DNA eingesetzt. Der Transfektionsvektor wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht linearisiert und am darauffolgenden Tag mit Ethanol präzipitiert. Der gewonnene Niederschlag wurde in 300µl PBS (Gibco Invitrogen) aufgenommen und direkt für die Elektroporation eingesetzt.

### **2.2.3.3.3 Aufreinigung und Elektroporation der Schizonten**

Nach 16-18 Stunden wurde die Übernachtskultur mit Hilfe eines Blutaussstriches auf ihre Qualität, d.h. auf das mehrheitliche Vorhandensein von Schizonten, überprüft. Dafür wurde der Kultur

zirka 1ml entnommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Erythrozyten durch eine kurze Zentrifugation (2 Minuten bei 7000rpm) sedimentiert. Von diesem Niederschlag wurde ein Aliquot für den Blutausschlag auf ein Objektträger überführt und dieser zur Analyse mit Giemsa gefärbt.

Die reifen Schizonten wurden von den nicht-infizierten Erythrozyten mit Hilfe eines Dichtegradienten getrennt. Dazu wurde die Übernachtskultur zu je 35ml in vier 50ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt, mit 10ml 55% Nycodenz/PBS unterschichtet und bei 1000rpm für 25 Minuten ohne Bremse zentrifugiert.

Durch diesen Zentrifugationsschritt bildet sich ein Ring aus hauptsächlich mit Schizonten infizierten Erythrozyten zwischen dem Nycodenz/PBS und dem Überstand des Kulturmediums. Der Ring aus Schizonten wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen, dabei die Schizonten von zwei Falcon-Röhrchen vereinigt und mit Kulturmedium auf ein Endvolumen von jeweils 30ml aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde erneut für 10 Minuten bei 1000rpm (ohne Bremse) zentrifugiert. Die zwei resultierenden Schizonten-Niederschläge wurden zu einem Niederschlag von 100µl vereinigt, welcher zirka  $10^8$  Schizonten enthält, die während der Elektroporation zirka  $10^9$  Merozoiten entlassen. Die 100µl Schizonten wurden sofort zur linearisierten Plasmid-DNA gegeben, das Gemisch in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette einem elektronischen Impuls von 800V und 25µFD ausgesetzt und schnell wieder auf Eis gestellt. Die Zeitkonstante sollte zwischen 0,8 und 1,4ms liegen.

Jeweils 200µl elektroporierte Parasiten wurden in die Schwanzvene von jungen (50 bis 60g) Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) injiziert.

### 2.2.3.3.4 Parasiten-Selektion

Am darauf folgenden Tag (Tag1) nach der Elektroporation wurde die Parasitämie der infizierten Ratten anhand Giemsa-gefärbter Blutausschläge analysiert. Dazu wurde den Ratten mittels Schwanzpunktion mit einer Kanüle ein Tropfen Blut abgenommen.

Während der letzten 24 Stunden konnten die Parasiten einen kompletten Zyklus der asexuellen Teilung ohne Selektionsdruck durch Pyrimethamin vollenden. Bei einer Anfangsparasitämie von  $\leq 0,1\%$  wurde die Transfektion abgebrochen.

Es wurde 27 bis 30 Stunden nach der Elektroporation mit der Pyrimethamin-Behandlung begonnen. Dazu wurde den Ratten 25mg/kg Körpergewicht Pyrimethamin intraperitoneal injiziert und dies alle 24 Stunden wiederholt, bis keine Parasiten mehr im Blutausschlag sichtbar waren. Die Behandlungsdauer betrug gewöhnlich drei bis fünf Tage. Acht bis zehn Tage nach der Elektroporation sollte eine Population Pyrimethamin-resistenter Parasiten (parentale resistente

Population) im Blutaussstrich sichtbar werden. Diese Ratten wurden für weitere zwei bis drei Tage mit Pyrimethamin behandelt. Während dieser Zeit sollte die Parasitämie trotz Behandlung weiter ansteigen. Sobald die ersten Pyrimethamin-resistenten Parasiten sichtbar wurden, wurde diese Population in eine naive SD-Ratte bzw. NMRI-Maus transferiert. Dafür wurde der parentalen Ratte durch Schwanzpunktion einige Tropfen Blut entnommen, mit 200µl PBS/Heparin (bzw. 100µl PBS/Heparin bei Mäusen) verdünnt und intraperitoneal in naive Tiere injiziert. Stieg auch bei diesen Transfer-Tieren durch Pyrimethamin-Behandlung die Parasitämie an, konnte eine weitere resistente Population gewonnen werden.

Der Transfer gewährleistet eine weitere Selektion der resistenten Parasiten. Um sicher zu gehen, dass hierbei nur Parasiten der parentalen-resistenten Population und keine Wildtyp-Parasiten passagiert werden, sollte die Parasitämie der parentalen Ratte zum Zeitpunkt des Transfers nicht höher als 1% liegen. Weitere Selektionen können durchgeführt werden, sobald im Transfer-Tier Parasiten im Blutaussstrich sichtbar sind.

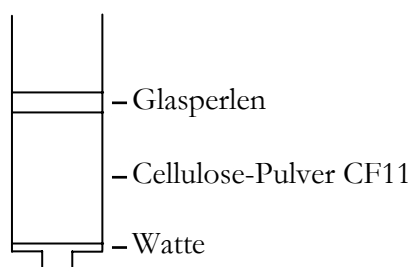
Zur Analyse der resistenten Parasiten-Population wurde das Blut der Ratten bzw. Mäuse bei einer Parasitämie  $\geq 1,5\%$  durch Herzpunktion entnommen und die genomische DNA isoliert. Ein Aliquot des Blutes wurde als Stabilat eingefroren, um damit zu einem späteren Zeitpunkt erneut Ratten oder Mäuse infizieren zu können.

### 2.2.3.3.5 Herstellung von *P. berghei*-Blutstabilaten

Zur längerfristigen Lagerung von Blutparasiten wurden Stabilate angefertigt. Dazu wurde 1 Teil Blut mit 2 Teilen Einfrierlösung (*Freezing-Solution*) gemischt und in einem 2ml Kryo-Röhrchen direkt in Flüssigstickstoff eingefroren.

### 2.2.3.3.6 Isolierung von Parasiten aus Ratten- bzw. Mäuse-Blut und Präparation der genomischen DNA

Um die Erythrozyten von den Lymphozyten und Thrombozyten zu trennen, wurde das Blut zunächst über eine Cellulose-Säule aufgereinigt. Diese setzte sich wie folgt zusammen:



Mit Hilfe der Glasperlen (212-300µm Durchmesser, *unwashed*) werden die Thrombozyten aus dem Blut entfernt und in der darauffolgenden Cellulose-Schicht bleiben die Lymphozyten hängen.

Je nach Blutvolumen wurde eine 5ml (für Mäuseblut) oder 20ml (für Rattenblut) Spritze verwendet und wie oben in der Skizze dargestellt gepackt. Bevor das Blut über die Säule gereinigt werden konnte, musste diese mehrmals mit 1x PBS äquilibriert werden. Im Anschluss wurde das Blut auf die Säule gegeben und durch Waschen mit 1x PBS die Erythrozyten eluiert. Das Eluat wurde in 15ml (Mäuse)- bzw. in 50ml (Ratten) Falcon-Röhrchen gesammelt. Die roten Blutkörperchen wurden durch Zentrifugation bei 1500rpm für 8 Minuten niedergeschlagen. Um die Zellmembran der Erythrozyten zu lysieren, wurde der Niederschlag in 0,2% Saponin/PBS resuspendiert. Die freigesetzten Parasiten wurden anschließend bei 2800rpm für 8 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Parasiten-Niederschlag wurde in 1ml 1x PBS aufgenommen, in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und erneut zentrifugiert (7000rpm, 2 Minuten). Anschließend wurde der Niederschlag in 200µl 1x PBS resuspendiert und zur weiteren Aufbereitung der genomischen DNA eingesetzt.

Für die weitere Isolierung der genomischen Parasiten-DNA wurde der *QIAamp DNA Blood Kit* (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die isolierte genomische DNA wurde mit 100-200µl Elutionspuffer eluiert. Das Elutionsvolumen war abhängig von der vorliegenden Parasitämie der Ratte bzw. der Maus. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei -20°C.

Die gewonnene genomische DNA der Parasiten aus der Pyrimethamin-resistenten Population konnte nun durch PCR mit spezifischen Oligonukleotidkombinationen analysiert werden.

### 2.2.3.3.7 Klonierung von Parasiten

Für die Isolierung eines Klons aus einem rekombinanten Parasiten wurde das Blut mit der entsprechenden Parasiten-Population so weit verdünnt, dass ein Parasit pro Maus injiziert werden konnte. Dazu wurde der infizierten Maus das Blut durch Herzpunktion entnommen, wenn die Parasitämie Werte zwischen 0,1 und 1% erreicht hatte. Um die Parasitämie möglichst exakt zu bestimmen, wurden mindestens 50 Gesichtsfelder im Blutausschlag ausgezählt und die Anzahl der infizierten Erythrozyten nach folgender Formel berechnet:

$$7 \times 10^6 \text{ (Erythrozyten/}\mu\text{l Blut)} \times \text{Parasitämie} \times 10^{-2} \text{ Parasiten/}\mu\text{l}$$

Mit RPMI 1640-Medium wurde das Blut entsprechend verdünnt, dass sich statistisch gesehen nur ein Parasit in 100µl Medium befindet. Diese Verdünnungen wurden in jeweils 15 NMRI-Mäuse

intravenös injiziert. Nach 8 bis 10 Tagen wurde die Parasitämie der Mäuse mit Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen überprüft.

Es sollten nicht mehr als 40% der Mäuse Blutstadien-positiv werden, denn nur dann kann davon ausgegangen werden, dass nur ein Parasit pro Maus injiziert wurde.

Bei einer Parasitämie der positiven Mäuse von zirka 1,5% wurde das Blut durch Herzpunktion entnommen. Ein Aliquot davon wurde als Stabilat in Flüssigstickstoff weggefroren und von dem restlichen Blut wurde die genomische DNA der Parasiten isoliert. Mittels PCR mit spezifischen Oligonukleotiden wurde getestet, ob ein rekombinanter Klon isoliert werden konnte.

#### 2.2.3.4 Herstellung von blutstadien-spezifischer Proteinextrakten

Um synchrone Blutstadien (Ringstadium, Trophozoitenstadium, Schizontenstadium) von *P. berghei*-Parasiten zu erhalten, wurden zunächst Schizonten, wie für die Transfektion beschrieben, generiert und aufgereinigt. Der erhaltene Schizonten-Niederschlag von zirka 100 bis 150µl wurde mit gleichem Volumen Kulturmedium gemischt. Jeweils 100µl dieser Schizonten wurden intravenös in junge (50-60g) Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) injiziert.

Ein Zyklus der asexuellen Vermehrung der Blutstadien von *Plasmodium berghei* ist in 22 bis 24 Stunden vollendet.

Dabei sieht die ungefähre zeitliche Abfolge der einzelnen Entwicklungsstadien wie folgt aus:



Das Auftreten der einzelnen Blutstadien wurde mit Hilfe von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen zu bestimmten Zeiten nach der Injektion der Schizonten kontrolliert. Das Ringstadium konnte 4 Stunden bzw. das Trophozoitenstadium 15 Stunden nach der Injektion isoliert werden. Dafür wurde den Ratten zu den angegebenen Zeiten das Blut mittels Herzpunktion entnommen und dieses, wie bei der Isolierung der genomischen DNA beschrieben (2.2.3.3.6), über eine CF11-Cellulose-Säule aufgereinigt. Es folgte die Lyse der Erythrozytenmembran mit 0,2% Saponin/PBS und das Anreichern der Parasiten bei 2800rpm für 8 Minuten. Der Parasiten-Niederschlag wurde mit 1ml 1x PBS gewaschen und anschließend in 30µl 2x SDS-Puffer aufgenommen. Für die Proteinextrakte von Schizonten wurde ein Aliquot von dem durch Gradientenzentrifugation aufgereinigten Schizonten-Niederschlag verwendet.

Die Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

### 2.2.3.5 Anreicherung von *P. berghei*-Gametozyten für die Herstellung von Proteinextrakten

Parasiten des Pyrimethamin-sensitiven *P. berghei*-Stamm NK65 wurden intraperitoneal in eine junge (50-60g) Sprague-Dawley-Ratte (SD-Ratten) injiziert. Bei einer Parasitämie von 3 bis 4% wurde das Tier mit Pyrimethamin (25mg/kg Körpergewicht) behandelt und somit die Gametozytenbildung induziert. Durch Pyrimethamin wird die Folatbiosynthese blockiert, wodurch die Parasiten im Wachstum gehemmt werden und zur Entwicklung der sexuellen Stadien gedrängt werden.

Am folgenden Tag wurde das Auftreten von Gametozyten mit Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen kontrolliert. Um einen Anhaltspunkt über die Dichte der vorhandenen Gametozyten zu erhalten, wurden diese in 10 Gesichtsfeldern gezählt und wie bei der Parasitämiebestimmung prozentual wie folgt berechnet:

$$(\text{Anzahl Gametozyten} / \text{Anzahl Erythrozyten}) \times 100 = \text{Gametozytenanteil in \%}$$

Der prozentuale Anteil an Gametozyten, der für die Aufreinigung verwendet wurde, lag zwischen 1,5 und 2%. Dann wurde das Blut der Ratte durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommen und zu 5ml Gametozyten-*complete*-Medium gegeben, das in einem 15ml Falcon-Röhrchen vorgelegt wurde. Die Aufreinigung des Blutes, d.h. die Entfernung der Lymphozyten und Thrombozyten, erfolgte über eine CF11-Cellulose-Säule (3ml CF11 Cellulose/ml Blut), die zuvor mit Gametozyten-*complete*-Medium äquilibriert wurde. Die Säule wurde, wie unter 2.2.3.3.6 beschrieben, aufgebaut. Durch Waschen der Säule mit Gametozyten-*complete*-Medium wurden die Erythrozyten eluiert und in einem 15ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Nach einer Zentrifugation bei 1900rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Niederschlag in 4ml Gametozyten-*complete*-Medium (2ml/ml Blut) resuspendiert und mit 4ml 48% Nycodenz/Gametozyten-*complete*-Medium unterschichtet. Der Gradient wurde bei 2600rpm für 15 Minuten (mit Bremse) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Durch diesen Schritt bildet sich eine Interphase aus hauptsächlich mit Gametozyten infizierten Erythrozyten, die vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in 1,5ml Eppendorf-Gefäße überführt wurde. Bei 7000rpm für 2 Minuten wurden die Gametozyten angereichert und zweimal mit 1x PBS gewaschen. Die Anreicherung der Gametozyten wurde mit einem Giemsa-gefärbten Ausstrich des Niederschlags kontrolliert, bevor dieser in 30µl 2x SDS-Puffer resuspendiert wurde. Die Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

### **2.2.3.6 Herstellung von *Plasmodium berghei*-Sporozoiten Proteinextrakten**

*Plasmodium berghei* Sporozoiten wurden wie unter 2.2.6 beschrieben aus infizierten *Anopheles*-Mücken isoliert und aufbereitet. Es wurden jeweils  $10^5$  Sporozoiten aliquotiert und bei 7000rpm für 2 Minuten (Raumtemperatur) abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit RPMI gewaschen, um das vorhandene BSA in der Sporozoiten-Suspension zu entfernen. Anschließend wurde der Sporozoiten-Niederschlag in  $10\mu\text{l}$  2x SDS-Puffer resuspendiert ( $10\mu\text{l}$  2x SDS-Puffer/ $10^5$  Sporozoiten) und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.

## **2.2.4 Tierexperimentelle Methoden**

### **2.2.4.1 Anästhesie und Blutentnahme von Ratten und Mäusen**

Um die Parasiten aus dem Blut der Nagetiere zu isolieren, wurde den Ratten bzw. Mäusen das Blut durch Herzpunktion entnommen. Dazu wurde jede Ratte bzw. Maus einzeln in ein Glasbehälter mit in Diethyläther getränkten Tüchern gesetzt. Nach 1 bis 2 Minuten sind die Tiere betäubt und schmerzfrei, so dass das Herz freigelegt und durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze das Blut entnommen werden konnte.

### **2.2.4.2 Applikationsmethoden**

Um die Nagetiere mit den Parasiten zu infizieren, wurden verschiedene Applikationsmethoden verwendet. Zum einen wurden die Parasiten durch geeignete Fixierung der Ratten bzw. Mäuse in den Bauchraum (intraperitoneal) bzw. direkt unter die Haut (subkutan) injiziert. Für die Injektion der Parasiten in die Schwanzvene (intravenös) wurden die Tiere in eine Glasröhre gesetzt und der Schwanz kurz in warmes Wasser getaucht, um die Venen besser sichtbar zu machen.

## **2.2.5 Zellkultur**

### **2.2.5.1 *Plasmodium falciparum*-Methoden**

#### **2.2.5.1.1 Kultivierung von *Plasmodium falciparum***

Die erythrozytären Parasitenstadien von *P. falciparum* können kontinuierlich in Kultur gehalten werden (Trager und Jensen, 1976).

Erythrozytäre Stadien von *P. falciparum* wurden in Petrischalen für Gewebekultur mit 10cm Durchmesser kultiviert. Pro Schale wurden 14ml Parasitenmedium und 0,5ml  $\text{A}^+$  Erythrozyten verwendet, so dass der Hämatokrit ungefähr 5% betrug. Die Kulturen wurden im Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$ , 3%  $\text{CO}_2$  und 5%  $\text{O}_2$  kultiviert.

Die Parasitämie wurde mittels Blutausschrieb kontrolliert und die Kulturen je nach Anwendung verdünnt bzw. das Medium gewechselt. Beim Mediumwechsel wurde das überstehende Medium

über den sedimentierten infizierten Erythrozyten abgenommen und durch 14ml vorgewärmtes (37°C), neues Medium ersetzt. Dabei wurden die Erythrozyten resuspendiert. Die Parasitämie der Kulturen sollte 5-10% nicht übersteigen, da toxische Abbauprodukte von den Parasiten in das Medium abgegeben werden und zum Absterben der Parasiten führen können. Zur Verdünnung und weiteren Erhaltung der Kultur wurde eine neue Petrischale mit frischem Medium und Erythrozyten mit der gewünschten Menge infizierter Erythrozyten der Ausgangsplatte beimpft.

### 2.2.5.1.2 Aufbereitung des humanen Serums

Humanes Serum (A<sup>+</sup>) wird aus Blutplasma gewonnen, indem die Gerinnungsfaktoren entzogen werden. Um Qualitätsunterschiede auszugleichen wurde das Plasma verschiedener Spender unter sterilen Bedingungen gemischt und anschließend in 50ml Falcon-Röhrchen aliquotiert. Pro 50ml Plasma wurden 800µl 1M CaCl<sub>2</sub> (steril filtriert) zugegeben. Das Plasma wurde 30 Minuten bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das geronnene Fibrin abzentrifugiert (4000rpm, 30 Minuten), das Serum für 30 Minuten bei 56°C inaktiviert und ohne den Überstand abzunehmen bei -20°C gelagert.

### 2.2.5.1.3 Aufbereitung der humanen Erythrozyten

Das Erythrozytenkonzentrat (leukozytenarm) stammt von einem Spender der Blutgruppe A, Rhesus<sup>+</sup>. Die Erythrozyten wurden in 50ml Falcon-Röhrchen aliquotiert, mit 10ml RPMI 1640 überschichtet und bei 2300rpm für 4 Minuten zentrifugiert. Dabei musste bei 300rpm die Bremse ausgeschaltet werden. Die Erythrozyten können 2 bis 3 Wochen verwendet werden.

### 2.2.5.1.4 Mikroskopische Darstellung von *P. falciparum* mittels Giemsa-Färbung und Bestimmung der Parasitämie

Zur Unterscheidung der einzelnen Parasitenstadien und zur Bestimmung der Parasitämie einer Kultur wurde ein Blutausstrich gemacht, der anschließend mit Giemsa gefärbt wurde.

Sedimentierte Erythrozyten wurden mit einer abgeflammt Pipette vom Boden der Petrischale abgenommen, auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Nach lufttrocknen des Ausstrichs wurde dieser mit Methanol fixiert und anschließend in frisch angesetzter Giemsa-Lösung (1:10 in VE-Wasser) für 5-15 Minuten gefärbt. Das überschüssige Giemsa wurde mit VE-Wasser von den Ausstrichen abgespült und diese dann getrocknet. Bei 100-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv erfolgte im Anschluss die Analyse am Lichtmikroskop.

Die Bestimmung der Parasitämie erfolgte wie unter 2.2.3.1 beschrieben.



### 2.2.5.1.5 Einfrieren und Auftauen von Parasiten

Das Einfrieren der Parasiten ist nur im Ringstadium möglich und die Parasitämie der Ringstadien sollte nicht unter 3% liegen, so dass die Parasiten nach dem Auftauen schnell anwachsen.

Infizierte Erythrozyten einer 10cm-Petrischale wurden für 2 Minuten bei 1900rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Volumen der sedimentierten Erythrozyten bestimmt. Es wurde das gleiche Volumen einer steril filtrierten Einfrierlösung (28% Glycerol, 3% Sorbitol, 0,65% NaCl) dazu gegeben, gemischt und die Suspension schnell in ein 2ml Kryo-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Parasiten in einem Gemisch aus 99% Ethanol und Trockeneis für 15 Minuten eingefroren und mindestens einen Tag bei -80°C gelagert, bevor sie in einen Flüssigstickstofftank deponiert wurden.

Zur Reaktivierung wurden die Parasiten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Pro 1ml Blut wurden 0,2ml 12% NaCl tropfenweise unter ständigem Mischen zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 5ml 1,6% NaCl langsam und unter ständigem Schütteln zugegeben. Es folgte erneut eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Anschließend wurden 5ml 0,9% NaCl/0,2% Glukose tropfenweise unter ständigem Mischen zugegeben und nach 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert (1900rpm, 2 Minuten, RT). Der Parasiten-Niederschlag wurde mit 25ml RPMI 1640 gewaschen, anschließend mit 13ml Kulturmedium resuspendiert, in eine Petrischale überführt und 0,5ml Erythrozyten zugegeben.

Alle verwendeten Salzlösungen wurden steril filtriert und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurden alle Medien und Lösungen bei 37°C aufgewärmt.

### 2.2.5.1.6 Synchronisierung von *P. falciparum*-Kulturen mit Sorbitol

Kontinuierliche Kultivierung von *P. falciparum* führt zu einem asynchronen Wachstum der Parasiten. Für einige Versuche ist es deshalb notwendig die Parasiten zu synchronisieren. Dazu wurde eine asynchrone Parasitenkultur abzentrifugiert (1900rpm, 2 Minuten, RT) und der Niederschlag in 9 Volumen sterilem, vorgewärmtem 5% D-Sorbitol (z.B. 4,5ml pro 0,5ml Parasiten-Niederschlag) resuspendiert. Bei der Synchronisation dringt das Sorbitol in das tubulär-vesikuläre System der Parasiten ein, das bei Ringstadien noch nicht so stark ausgeprägt ist. Nach einer Inkubation bei 37°C im Wasserbad für 3 bis 5 Minuten wurde erneut abzentrifugiert (1900rpm, 2 Minuten, RT), das Sediment in 10 bis 12ml Kulturmedium resuspendiert und einmal gewaschen. Dabei platzen alle späten Parasitenstadien aufgrund eines osmotischen Schocks bei Wechsel von Sorbitol zu RPMI 1640 (Lambros und Vanderberg, 1979). Kulturen sollten deshalb nur synchronisiert werden, wenn überwiegend Ringstadien vorhanden sind.

Um Parasiten vollständig zu synchronisieren wurde die Sorbitolbehandlung nach 4 bis 6 Stunden wiederholt, um so zuvor reifere Ringstadien, die sich nun schon zu Trophozoiten entwickelt haben, ebenfalls zu erfassen.

Um hoch synchrone Kulturen von *P. falciparum* zu erhalten, wurde die Prozedur nach einem Zyklus (~48 Stunden) wiederholt.

### **2.2.5.1.7 Anreicherung von *P. falciparum*-Schizonten durch magnetische Separation**

Malariaparasiten verstoffwechseln das Hämoglobin der Erythrozyten wobei unlösliche, oxidierte Häm-Produkte entstehen, die als Hämozoïn polymerisieren. Aufgrund der paramagnetischen Eigenschaft des Hämozoïn, lassen sich Trophozoiten und Schizonten mittels magnetischer Separation von nicht-infizierten Erythrozyten und Parasiten im Ringstadium trennen. Mit dieser Methode werden Parasitämien von bis zu 95 bis 99% erreicht.

Als Ausgangsmaterial diente eine synchronisierte Blutkultur, die mit jungen und älteren Schizonten angereichert war und möglichst wenige Trophozoiten enthielt. Dies wurde mit Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen kontrolliert. Die magnetische Säule wurde zunächst außerhalb des Magneten mit zirka 5ml MACS Säulenpuffer (0,5% BSA/2mM EDTA/PBS) zwei- bis dreimal gespült. Im Magneten platziert wurde die Fließgeschwindigkeit auf sehr langsam eingestellt um eine gute Bindung der Parasiten zu gewährleisten. Anschließend wurden die Parasiten in Kulturmedium auf die Säule gegeben und solange mit MACS Säulenpuffer gespült, bis der Durchfluss klar erschien und keine Erythrozyten mehr enthielt. Die Elution der infizierten Erythrozyten erfolgte außerhalb des Magneten bei schneller Fließgeschwindigkeit, wobei das Eluat in einem 15ml Falcon-Röhrchen gesammelt wurde. Durch eine Zentrifugation bei 1900rpm für 2 Minuten wurden die Parasiten sedimentiert. Um die Qualität der angereicherten Schizonten zu überprüfen, wurde von diesem Niederschlag ein Blutaussstrich gemacht und unter dem Mikroskop analysiert.

Ausgehend von diesem Niederschlag wurde entweder die Zellmembran der Erythrozyten mit 0,2% Saponin/PBS lysiert, das erhaltene Parasiten-Sediment mit 1x PBS gewaschen und anschließend in Lysispuffer für die mRNA-Isolierung aufgenommen, oder, nach einmal waschen mit 1x PBS, direkt in Lysispuffer für die mRNA-Isolierung resuspendiert.

### **2.2.5.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Zellen, die adhären in *Monolayer*-Schichten in Petrischalen oder Kulturflaschen wachsen, benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung regelmäßig Wechsel des Mediums. Sie sollten vor Erreichen der vollständigen Konfluenz subkultiviert werden (Lindl, 2000). Um

adhärent wachsende Zellen passagieren zu können, müssen sie durch eine Trypsin-Behandlung vom Boden der Kulturflasche und von den Nachbarzellen gelöst werden.

Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen mit 20 bis 25ml HBSS gewaschen, um das im Kulturmedium vorhandene FCS zu entfernen. Anschließend wurde soviel Trypsin/EDTA zugegeben, dass die Zellen bedeckt wurden. Eine Inkubation bei 37°C für 1 bis 3 Minuten beschleunigte das Ablösen der Zellen. Diese wurden im Anschluss in zirka 10ml Kulturmedium aufgenommen und einmal gewaschen (800rpm, 3 Minuten), um verbleibende Trypsin-Reste zu entfernen. Ein Aliquot der in 10ml Kulturmedium resuspendierten Zellen konnte nun in eine neue Kulturflasche überimpft werden oder für die Bestimmung der Zellzahl verwendet werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.5.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Um definierte Zellzahlen ausplattieren zu können ist die genaue Bestimmung der Zellzahl notwendig. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer können Zellsuspensionen in geeigneter Verdünnung ausgezählt werden (Lindl, 2000).

Um die Zellzahl der adhärent wachsenden Zellen bestimmen zu können, wurden diese zunächst, wie unter 2.2.5.2 beschrieben, mit Trypsin behandelt. Nach dem Waschen des Zell-Niederschlags wurde dieses in 10ml Kulturmedium resuspendiert und ein Aliquot für die Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer-Zählkammer entnommen.

Gezählt wurden die Zellen in den vier Großquadranten; noch zusammenhängende Zellen wurden einfach gezählt. Die Zellzahl pro ml wurde nach folgender Formel ermittelt:

$(\text{Anzahl Zellen in 4 Quadranten}/4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Anzahl Zellen/ml}$ .

### 2.2.5.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese mittels Trypsinbehandlung, wie unter 2.2.5.2 beschrieben, vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und bei 800rpm für 3 Minuten abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff der Zellen mit Kulturmedium. Das erhaltene Sediment wurde in 2 bis 3ml Kulturmedium aufgenommen und mit gleichem Volumen Einfriermedium (*Freezing-Solution*) versetzt, in Kryo-Röhrchen aliquotiert und langsam bei -80°C eingefroren. Die Einfrierbox enthält Isopropanol, das ein langsames (Abkühlung von 1°C pro Minute) und damit schonendes Einfrieren der Zellen gewährleistet. Eingefrorene Zellen können dann in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese kurz bei 37°C im Wasserbad inkubiert und schnell in ein 15ml Falcon-Röhrchen mit vorgelegtem, warmen Kulturmedium überführt. Nach einer

Zentrifugation bei 800rpm für 3 Minuten wurde das Zell-Sediment mit 10ml Kulturmedium gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1ml Kulturmedium aufgenommen und in eine mit 10 bis 15ml Medium vorgelegte Kulturflasche gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt.

### 2.2.6 *Anopheles*-Moskito-Methoden

Nach Aufnahme von Gametozytenstadien aus dem infizierten Blut der Ratten bzw. Mäusen während der Blutmahlzeit entwickeln sich die Parasiten im Mitteldarm der *Anopheles*-Mücke zu Oozysten. Es wird davon ausgegangen, dass sich bereits zwischen Tag 9 und Tag 11 nach der Blutmahlzeit die ersten Oozysten in den Mitteldarmepithelien gebildet haben. Die Anzahl der Oozysten pro Moskito-Mitteldarm geben Auskunft über die Infektivität des einzelnen Moskito bzw. bei der Betrachtung mehrerer Moskitos aus einem Käfig, über die ungefähre Infektion einer Population.

Um Oozysten untersuchen zu können, wurde den weiblichen Moskitos der Mitteldarm herauspräpariert. Dazu wurden 3 bis 6 Moskitos aus dem Käfig abgesaugt und durch einen Kälteschock von 3 Minuten bei -20°C betäubt. Die betäubten Moskitos wurden nacheinander auf eine Glasplatte mit RPMI/3% BSA gegeben und die Mitteldärme unter dem Binokular durch Trennung des Abdomens vom Thorax herauspräpariert. Dabei wurde das Abdomen vorsichtig nach hinten abgestreift, so dass der am Thorax verbleibende Mitteldarm frei lag und abgetrennt werden konnte. Die isolierten Mitteldärme wurden auf einen Objektträger mit RPMI/3% BSA überführt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Anwesenheit von Oozysten konnte nun unter dem Lichtmikroskop untersucht werden.

Die Isolierung von Mitteldarm-Sporozoitien erfolgte an Tag 14 bis Tag 15 nach der infektiösen Blutmahlzeit, da zu diesem Zeitpunkt die Heranreifung der Oozysten im Mitteldarm bereits rasch vorangeschritten ist und erste Mitteldarm-Sporozoitien freigesetzt werden.

Zur Gewinnung von Mitteldarm-Sporozoitien wurden zunächst die Mitteldärme, wie oben beschrieben, isoliert und in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß gesammelt. Anschließend wurden die Mitteldärme mit einem Stößel homogenisiert und bei 1000rpm für 3 Minuten (4°C) zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Sporozoitien befinden, wurde fast vollständig abgenommen und in ein neues 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt. Der Niederschlag und der noch vorhandene Rest des Überstandes wurde erneut homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vollständig abgenommen und mit dem Ersten vereinigt.

An Tag 16 bis Tag 19 nach der Blutmahlzeit wurden die Speicheldrüsen-Sporozoitien aus den Moskitos isoliert. Dazu wurden den betäubten Moskitos vorsichtig die Speicheldrüsen in RPMI/3% BSA herauspräpariert und in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß gesammelt. Durch Homogenisieren dieses Gemisches aus Speicheldrüsen und RPMI/3%BSA und zentrifugieren, wie oben beschrieben, wurden die Speicheldrüsen-Sporozoitien gewonnen.

### 2.2.6.1 Bestimmung der Sporozoitienzahl

Um die genaue Anzahl der Sporozoitien aus dem Mitteldarm sowie aus den Speicheldrüsen pro Mosquito bestimmen zu können, wurden die isolierten Sporozoitien in geeigneter Verdünnung in der Neubauer-Zählkammer nach folgender Formel ausgezählt:

$$(\text{Anzahl Sporozoitien in 4 Quadraten}/4) \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Sporozoitien/ml}$$

Anzahl Sporozoitien in vorliegendem Gesamtvolumen/Anzahl Moskitos/Infektivität = Anzahl der Sporozoitien pro Mosquito

## 2.2.7 Zellbiologische Methoden

### 2.2.7.1 Immunfluoreszenz-Färbungen

Durch Immunfluoreszenz-Analysen kann die Expression und die zelluläre Lokalisierung eines Proteins in fixierten Zellen und Geweben unmittelbar durch Betrachtung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Nach der Vorbehandlung der Zellen durch Fixierung und/oder Permeabilisation werden sie mit einem, gegen das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper behandelt. In einem nachfolgenden Schritt wird an diesen ein zweiter Antikörper gebunden, an den ein Fluoreszenz-Farbstoff (z.B. Alexa-488) gekoppelt ist. Durch Betrachtung unter UV-Licht mit einem Filter der entsprechenden Wellenlänge können die fluoreszierenden Immunkomplexe in den Zellen sichtbar gemacht werden.

#### 2.2.7.1.1 *Gliding Motility-Assay* der *Plasmodium berghei*-Sporozoitien

Mit dieser Methode kann das typische, Substrat-abhängige Bewegungsmuster der Speicheldrüsen-Sporozoitien untersucht werden. Beim *gliding* über eine BSA-beschichtete Oberfläche hinterlassen die Sporozoitien eine Spur von Oberflächenproteinen, die mit einem spezifischen Antikörper angefärbt werden kann (Stewart und Vanderberg, 1988).

Um das typische Bewegungsmuster der Sporozoiten zu untersuchen wurde zunächst ein 8 *well*-Objektträger mit je 30µl RPMI/3% BSA pro *well* für 20 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Oberfläche mit BSA zu bedecken. Dazu und für alle weiteren Schritte wurde der Objektträger in eine Feuchtkammer platziert. Nach Abnahme des Mediums wurden die isolierten Speicheldrüsen-Sporozoiten, wie unter 2.2.6 und 2.2.6.1 beschrieben, in einer bestimmten Anzahl (10000 Sporozoiten/*well*) auf die *wells* gegeben und für weitere 15 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dieser Inkubationsschritt aktiviert bzw. beschleunigt die Bewegung der Sporozoiten. Nach vorsichtigem Abziehen des Mediums wurden die Sporozoiten mit 4% Formaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, zweimal mit 1% FCS/PBS gewaschen und mit 10% FCS/PBS über Nacht bei 4°C oder eine Stunde bei 37°C blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, anti-*Pb*CSP (1:300 in 10% FCS/PBS), für 1 Stunde bei 37°C. Nach drei Waschschritten mit 1% FCS/PBS wurden die Sporozoiten mit dem sekundären Immunfluoreszenz-Antikörper anti-Maus-Alexa-Fluor 488 (1:300) eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Bevor das Präparat mit 50% Glycerin in PBS eingebettet wurde (*mounting*), wurde der sekundäre Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt. Das Präparat wurde dann mit Nagellack luftdicht verschlossen und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 2.2.7.1.2 *EEF-development-Assay* mit *Plasmodium berghei*-Sporozoiten

Bevor *Plasmodium*-Parasiten die Erythrozyten infizieren, durchlaufen die Sporozoiten in den Hepatozyten ein Stadium der Schizogonie, bei dem sie als Exo-erythrozytäre-Form (EEF) vorliegen. *In vitro* können diese Stadien in Hepatozyten-Zelllinien (Huh7) kultiviert und nach Antikörperfärbung analysiert werden (Hollingdale *et al.*, 1983).

Zur Analyse von EEF-Formen wurden ein Tag vor dem Experiment die Hepatozyten-Zellen (Huh7) in 8-*well Chamberslides* ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert. Dazu wurden die Zellen, wie unter 2.2.5.2 beschrieben, mit Trypsin behandelt und die Zellzahl (2.2.5.2.1) bestimmt. In einem Gesamtvolumen von 400µl wurden  $3 \times 10^4$  Zellen/*well* ausgesät und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Analyse der EEF-Entwicklung wurden die Speicheldrüsen-Sporozoiten isoliert (2.2.6), in einem Volumen von 100µl 10000 Sporozoiten pro *well* auf die Zellen gegeben und für die Invasion der Sporozoiten in die Hepatozyten 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Suspension von den Zellen abgenommen, die Zellen zweimal mit vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und anschließend mit 400µl vorgewärmtem Kulturmedium/1x *round-up* bedeckt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. An Tag 2 wurde das Medium morgens und abends gewechselt und nach 42 bis 44 Stunden nach der Invasion wurden die Zellen mit kaltem (-20°C) Methanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur

fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1% FCS/PBS folgte der Blockierungsschritt mit 10% FCS/PBS über Nacht bei 4°C oder alternativ 1 Stunde bei 37°C. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, anti-*Pb*HSP70 (1:1 in 10% FCS/PBS) bzw. mit dem sekundären Antikörper, anti-Maus-Alexa-Fluor 488 (1:300) erfolgte für 1 Stunde bei 37°C. Dazwischen und nach dem sekundären Antikörper wurden die Zellen dreimal gewaschen. Anschließend wurde das Präparat eingebettet (50% Glycerin in PBS), mit Nagellack luftdicht verschlossen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die Entwicklung von Speicheldrüsen-Sporozoit zu Exo-erythrozytären-Formen (EEF) kann auch zu jedem anderen beliebigen Zeitpunkt nach der Invasion in Hepatozyten (frühe/späte Leberstadien) gestoppt werden.

### **2.2.7.2 Mikroskopie**

#### **2.2.7.2.1 Immunofluoreszenz-Mikroskopie**

Mit Hilfe der Immunofluoreszenz-Mikroskopie kann die Expression bzw. Lokalisation eines spezifischen Proteins sichtbar gemacht werden. Dabei wird ein Antikörper verwendet, an den ein bestimmtes Fluorochrom gekoppelt ist (2.2.7.1). Das „gefärbte“ Objekt wird nun durch kurzwellige Erregerstrahlung unter dem Mikroskop beleuchtet und das längerwellige Fluoreszenzlicht wird durch entsprechende Filter oder Farbteiler registriert.

#### **2.2.7.2.2 Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie**

Bei einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop handelt es sich um ein Lichtmikroskop, an das eine LSM-Einheit, bestehend aus Laser- und Scanning-Modul, gekoppelt ist. Dadurch werden einzelne Ebenen eines Objekts gescannt und können zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden. Das vom Laser erzeugte Licht mit einer bestimmten Wellenlänge wird über einen Farbteiler (dichromatischer Spiegel) auf das Objekt gelenkt. Aus der Fokusebene emittiertes Licht durchtritt den Spiegel und gelangt über verschiedene Scanspiegel zu dem Photomultiplier (Lichtdetektor), der je nach Stärke des auftreffenden Lichts ein entsprechendes analoges elektrisches Signal erzeugt. Durch zusätzliche Emissionsfilter (Bandpass- und Langpassfilter) vor dem Photomultiplier wird der gewünschte Wellenlängenbereich eingeschränkt. Aufgrund der Scanspiegel und Emissionsfilter können die verschiedenen Wellenlängen auch in unterschiedlichen Kanälen angezeigt werden. Zusätzlich ermöglicht eine variable Lochblende (*Pinhole*), dass nur Lichtstrahlen aus der Fokusebene zu dem Photomultiplier gelangen und das Bild erzeugen. Lichtstrahlen aus den Ebenen ober- und unterhalb des Fokus werden, im

Gegensatz zur normalen Fluoreszenzmikroskopie, ausgeblendet. Dadurch wird eine hochauflösende Abbildung des Objekts gewährleistet.

### 2.2.8 Biochemische Methoden

#### 2.2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch den Zusatz des Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und erhalten eine negative Oberflächenladung. Es entstehen Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. Während SDS nichtkovalente Wechselwirkungen unterbindet, reduziert das im Ladebuffer zugesetzte  $\beta$ -Mercaptoethanol die zur Stabilisierung der Proteine vorhandenen Disulfidbrücken. Bei der Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zur Anode.

Bei dem verwendeten Puffersystem handelt es sich um das diskontinuierliche Tris-Glycin System (Laemmli, 1970). Ein Sammelgel (großporig, Tris-Glycin-Puffer pH6,8) überschichtet dabei ein Trenngel (engporig, Tris-Glycin-Puffer pH8,8). Bei der Wanderung durch das Sammelgel werden die Proteine zunächst in einer schmalen Zone konzentriert bevor sie in das Trenngel eintreten und dort nach ihrer molaren Masse aufgetrennt werden. Das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine in den verschiedenen Gelabschnitten ist abhängig vom pH-unabhängigen Verhalten der Chloridionen (Leit-Ion) im Gegensatz zu dem pH-abhängigen Laufverhalten des Folge-Ions Glycin.

#### Durchführung

Die mit 70%-igem Ethanol gereinigten Glas- und Aluminiumplatte wurde in die Gießapparatur eingespannt. Anschließend wurden die Chemikalien für das Trenn -und Sammelgel in folgender Zusammensetzung gemischt (Angaben pro Gel):



Chemikalien	Volumina der Chemikalien für das Trenngel				Volumina der Chemikalien für das Sammelgel (3,6%)
	8%	10%	12%	15%	
Protogel	1,998ml	2,498ml	3,0ml	3,75ml	350µl
1,5M Tris pH8,8	1,875ml	1,875ml	1,875ml	1,875ml	-
1M Tris pH6,8	-	-	-	-	350µl
10% SDS	75µl	75µl	75µl	75µl	30µl
ddH <sub>2</sub> O	3,469ml	2,97ml	2,468ml	1,718ml	1,75ml
10% APS	75µl	75µl	75µl	75µl	20µl
TEMED	7,5µl	7,5µl	7,5µl	7,5µl	20µl

Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, welches nach der Polymerisation durch dreimaliges Spülen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt wurde. Es folgte das Gießen des Sammelgels.

Die Proben wurden vor dem Laden auf das Gel mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt, 5 Minuten bei 80 bis 85°C inkubiert und anschließend für 5 Minuten abzentrifugiert (13200rpm, Raumtemperatur). Es wurden jeweils 10 bis 15µl Probe bzw. 10µl Protein-Marker (*Rainbow Protein Marker*, Amersham) pro Tasche geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1x Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer bei 25 bis 35mA. Danach wurden die aufgetrennten Proteine entweder mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht oder auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

### 2.2.8.2 Coomassie-Färbung

Die aufgetrennten Proteine auf einem SDS-Gel lassen sich z.B. durch Coomassie anfärben. Dazu wurde das SDS-Gel nach der Auftrennung für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Coomassielösung inkubiert. Vor der Zugabe der Entfärbelösung wurde das Gel mit ddH<sub>2</sub>O mehrmals gespült, um die Färbelösung zu entfernen. Entfärbt wurde für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Die Gele wurden entweder mit Hilfe einer Vakuumpumpe auf Whatman-Papier getrocknet oder direkt eingescannt.

### 2.2.8.3 Western-Blot-Analysen

Diese Methode nutzt die Spezifität von Antikörpern zur Detektion von Proteinen nach der Gelelektrophorese. Zu diesem Zweck werden die Proteine nach erfolgter Auftrennung z.B. auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für bestimmte Proteine spezifisch ist.

#### Durchführung

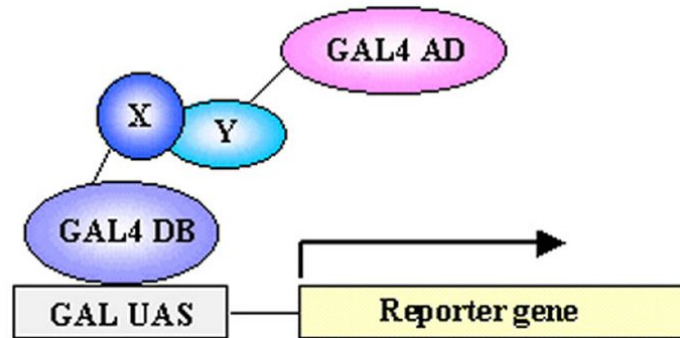
Vor Beginn des Transfers der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese zuerst kurz in ddH<sub>2</sub>O und anschließend in 1x Transferpuffer inkubiert. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Ein in Transferpuffer getränkter Blottingsschwamm wurde auf der Kathodenseite platziert, gefolgt von drei ebenfalls mit Transferpuffer befeuchteten Whatman-Papieren. Als nächste Schichten folgten das Trenngel, die vorbehandelte Nitrocellulosemembran und drei weitere mit Transferpuffer befeuchtete Whatman-Papiere. Nach jeder aufgelegten Schicht wurden die eventuell vorhandenen Luftblasen entfernt. Abschließend wurde auf der Anodenseite nochmals ein in Transferpuffer getränkter Blottingsschwamm gelegt. Geblottet wurde für 1 Stunde bei 4°C und 65V in einer Mini Tank Transfer Einheit, gefüllt mit Transferpuffer. Die Membran wurde nach erfolgtem Transfer kurz in TBST-Puffer inkubiert und anschließend entweder für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung (5% Milchpulver/TBST) abgesättigt. Nach zwei Waschschritten mit TBST-Puffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in 5% Milchpulver/TBST, für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4°C über Nacht. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit TBST-Puffer für jeweils 10 bis 15 Minuten gewaschen bevor die Inkubation des sekundären Antikörpers (in 5% Milchpulver/TBST) für 1 Stunde bei Raumtemperatur folgte. Nach weiteren Waschschritten wurde die Membran für die Detektion mit der Chemilumineszenzsubstratlösung 1 und 2 (im Verhältnis 1:1) beschichtet, zirka 3 Minuten inkubiert und anschließend in eine Filmkassette überführt. Es folgte die Exponierung gegen einen Film in der Dunkelkammer und die Entwicklung.

Die verwendeten Antikörper sind im Materialien-Abschnitt zusammengefasst.

### 2.2.8.4 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit dem *yeast-two-hybrid*-System

Mit diesem System lassen sich Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* nachweisen und ganze Bibliotheken nach interagierenden Proteinen absuchen. Es basiert auf der modular-aufgebauten Organisation vieler bekannter Transkriptionsfaktoren. Viele dieser Proteine haben zwei oder

mehr unabhängige strukturelle und funktionelle Einheiten, oder Domänen. In Abbildung 2.1 ist eine schematische Darstellung des *yeast-two-hybrid*-Systems gezeigt.



**Abb.2.1: Schematische Darstellung des *yeast-two-hybrid*-Systems.** Die beiden Proteine X und Y sind mit der DNA-bindenden Domäne bzw. mit der transaktivierenden Domäne des Transkriptions-Aktivators GAL4 fusioniert. Die Expression der Reportergene ist nur bei Interaktion von X und Y möglich.

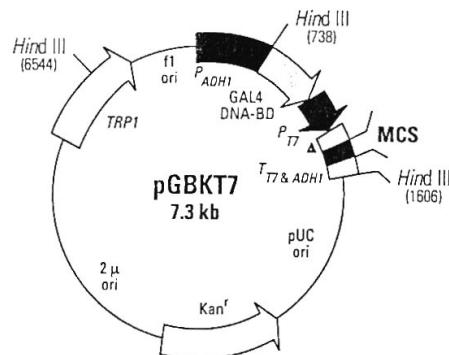
Hierbei ist das intakte Gal4-Protein der Transkriptions-Aktivator, der zwei getrennte Funktionen ausführt. Gal4 besteht aus einer DNA-Bindedomäne (Gal4 DB) und einer Aktivierungsdomäne (Gal4 AD). Die DNA-Bindedomäne interagiert mit dem Promotor und die Aktivierungsdomäne mit der RNA-Polymerase. Das Gal4-Protein bleibt inaktiv sofern sich nicht ihre beiden Domänen nähern. Wenn Gal4 an die DNA-Erkennungssequenz bindet, wird die Aktivierungsdomäne dem Promotor näher gebracht und erlaubt somit der Aktivierungsdomäne mit der Transkriptionsmaschinerie zu interagieren und eine Aktivierung der Transkription hervorzurufen. Diese Domänen werden für die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen im *yeast-two-hybrid*-System herangezogen. Zum einen können zwei auf ihre Interaktion zu untersuchenden Proteine oder Proteindomänen auf DNA-Ebene mit der DNA-bindenden Domäne von Gal4 bzw. mit der separaten Transaktivierungsdomäne von Gal4 fusioniert werden. Zum anderen kann eine cDNA-Bibliothek auf mögliche Interaktionspartner zu einem bekannten Protein untersucht werden. Dazu wird das bekannte Protein („Fänger-Protein“) meistens mit der DNA-bindenden Domäne von Gal4 und die cDNA-Bibliothek mit der Transaktivierungsdomäne von Gal4 fusioniert. Nach Transfektion eines Hefestammes mit beiden Konstrukten kann die Expression der Reportergene nur dann beobachtet werden, wenn beide Proteine bzw. das Fänger-Protein mit einem Protein aus der cDNA-Bibliothek spezifisch interagieren, d.h. wenn die beiden Domänen des Transkriptions-Aktivators Gal4 in räumliche Nähe gekommen sind. Bei diesem System finden die Interaktionen im Zellkern statt, das bedeutet, dass alle beteiligten Proteine nach ihrer Synthese in den Zellkern transportiert werden müssen.

### 2.2.8.4.1 Konstruktion der „Fänger“-(*bait*) Plasmide

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner wurden die zu untersuchenden Proteine bzw. Proteindomänen (*bait*-Proteine) als C-terminale Fusion an die DNA-bindende Domäne (DNA-BD) von Gal4 fusioniert. Dazu wurde der Vektor pGBKT7 (*BD Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit*, Clontech) verwendet, der in Abbildung 2.2 dargestellt ist.

In Hefe werden die Fusionsproteine von dem konstitutiven *ADH1*-Promotor ( $P_{ADH1}$ ) exprimiert. Die Transkription wird an den *T7* und *ADH1* Stoppsignalen beendet ( $T_{T7\&ADH1}$ ). Der Vektor enthält außerdem einen *c-Myc-tag* für die Detektion der Fusionsproteine durch Antikörper, den *T7*-Promotor für die *in vitro* Transkription und Translation der *c-Myc*-Fusionsproteine und einen Polylinker (MCS, *multiple cloning site*). pGBKT7 repliziert sich unabhängig in *E. coli* sowie in *S. cerevisiae* und enthält für die Selektion in *E. coli* die Kanamycin-Kassette bzw. den *TRP1*-Marker für die Selektion in *S. cerevisiae*.

Der Polylinker enthält einmalige Restriktionsschnittstellen, die im gleichen Leserahmen mit dem 3'-Ende der Gal4-DNA-Bindungsdomäne liegen. Diese wurde zur Konstruktion der Fusionsproteine Gal4-DNA-BD und *bait*-Proteine verwendet.



**Abb.2.2: Restriktionskarte von pGBKT7.** Der Vektor exprimiert Proteine in *S. cerevisiae*, die an die Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4-DNA-BD) fusioniert werden. Er dient zur Konstruktion der *bait*-Fusionsproteine im *yeast-two-hybrid*-System.

### 2.2.8.4.2 Transfektion von Hefezellen

Zur Transfektion von Hefezellen wurde die Lithiumacetat-Methode (Gietz *et al.*, 1992) verwendet. Alle verwendeten Stocklösungen wurden autoklaviert und die jeweiligen Lösungen wurden vor jeder Transfektion frisch angesetzt.

Für die Transfektion mussten zunächst kompetente Hefezellen hergestellt werden. Dazu wurde die am Vortag angeimpfte Übernachtskultur des jeweiligen Hefestamms auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 bis 0,2 in einem Gesamtvolumen von 50ml des jeweiligen Mediums eingestellt und bei 30°C, 250rpm geschüttelt. Bei einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,8 wurde die Hefekultur in ein 50ml

Falcon-Röhrchen überführt und bei 2000rpm für 5 Minuten (Raumtemperatur) abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 50ml sterilem ddH<sub>2</sub>O, worauf die Zellen erneut zentrifugiert wurden. Der Niederschlag wurde in 3ml 1,1x Lithiumacetat/TE (0,1M Lithiumacetat, 10mM TRIS/HCl, 1mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen und auf zwei 1,5ml Eppendorf-Gefäße verteilt. Durch eine kurze Zentrifugation bei 13000rpm für 15 Sekunden wurden die Zellen sedimentiert und anschließend erneut in 1,1x Lithiumacetat/TE aufgenommen (kompetente Hefezellen). Dabei hängt das Volumen des 1,1x Lithiumacetat/TE von der Anzahl der zu transfizierenden Ansätzen ab, wobei pro Transfektionsansatz 100µl Zellen eingesetzt werden.

Die Transfektion erfolgte durch Hitzeschock der kompetenten Hefezellen. Dazu wurden in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß 0,1µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA mit 0,1mg *carrier*-DNA (Heringssperma-DNA; 10mg/ml) gemischt. Nach der Zugabe von jeweils 100µl kompetenter Zellen pro Ansatz wurden diese durch kurzes vortexen gemischt. Anschließend wurden 600µl PEG/Lithiumacetat (40% PEG 4000, 0,1M Lithiumacetat, 10mM TRIS/HCl, 1mM EDTA, pH 7,5) zugegeben und für 10 Sekunden auf dem Vortexer gemischt. Es folgte eine Inkubation der Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Drehrad, der Hitzeschock bei 42°C für 15 Minuten und eine 2-minütige Abkühlung der Ansätze auf Eis. Im Anschluss an die Zentrifugation bei 4000rpm für 1 Minute (Raumtemperatur) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und der Niederschlag in jeweils 500µl sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Je 100µl davon wurden auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert, diese mit Parafilm verschlossen und 3 bis 4 Tage bei 30°C inkubiert.

Als Negativkontrolle bzw. Sterilkontrolle wurde immer ein Ansatz mit nur *carrier*-DNA transfiziert.

### 2.2.8.4.3 Proteinextraktion aus Hefezellen

Für die Isolierung von Proteinen aus Hefezellen wurde die Harnstoff/SDS-Methode (modifiziert nach Printen und Sprague, 1994) verwendet. Dazu wurde eine Hefe-Übernachtkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 in einem Volumen von 50ml des jeweiligen Mediums eingestellt und bei 30°C, 250rpm wachsen gelassen. Bei einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,6 wurde die Kultur auf zwei vorgekühlte und halb mit Eis befüllte 50ml Falcon-Röhrchen verteilt.

Für die Berechnung der Gesamtanzahl der OD<sub>600</sub> Units (*total number of OD<sub>600</sub> units*), die im Folgenden benötigt wird, wurde die optische Dichte und das vorliegende Kulturvolumen notiert. Diese wurde wie folgt berechnet:

Gesamtanzahl der OD<sub>600</sub> Units = OD<sub>600</sub> x Kulturvolumen

Nach Zentrifugation der Kultur bei 2200rpm für 5 Minuten (4°C) wurde der Niederschlag mit 50ml sterilem, eiskaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und wie oben sedimentiert. Der Niederschlag wurde dann für 10 Minuten auf Trockeneis inkubiert und somit eingefroren. Für die weitere Isolierung der Proteine wurde der *Cracking-Puffer complete* auf 60°C im Wasserbad vorgewärmt. Dann wurde der Hefe-Niederschlag durch Resuspendieren mit vorgewärmten *Cracking-Puffer complete* schnell aufgetaut. Dabei richtete sich das Volumen an Puffer nach der ermittelten Gesamtanzahl der OD<sub>600</sub> Units bzw. errechnete sich wie folgt:

100µl *Cracking-Puffer complete*/Gesamtanzahl der OD<sub>600</sub> Units von 7,5

Nach dem Resuspendieren wurde der Ansatz in ein 1,5ml Schraubdeckel-Eppendorf-Gefäß gefüllt mit Glassperlen (425-600µm, *acid washed*) überführt. Dabei wurde die Menge an Glassperlen wie folgt berechnet:

80µl Glassperlen/Gesamtanzahl der OD<sub>600</sub> Units von 7,5

Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubation der Probe, gemischt mit den Glassperlen, bei 70°C im Heizblock wurde diese für 1 Minute auf dem Vortexschüttler gemischt. Danach wurde bei 13200rpm für 6 Minuten (4°C) zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5ml Schraubdeckel-Eppendorf-Gefäß überführt und schnell auf Eis gestellt. Die Zellen wurden einer weiteren Hitzebehandlung unterzogen. Dafür wurde der Ansatz für 3 bis 5 Minuten in einem kochenden Wasserbad inkubiert, anschließend für 1 Minute gevortext und abzentrifugiert (13200rpm, 5 Minuten, 4°C). Der erhaltene Überstand wurde mit dem Ersten vereinigt. Die Proteinextrakte konnten nun auf einem SDS-Gel analysiert oder bei -80°C gelagert werden.

#### **2.2.8.4.4 Herstellung der cDNA-Bibliothek für das *yeast-two-hybrid screening***

##### Isolierung der m-RNA

Die Isolierung der mRNA für das *yeast-two-hybrid screening* aus Speicheldrüsen-Sporozoit, *Plasmodium berghei* Schizonten bzw. *Plasmodium falciparum* Schizonten wurde, wie unter 2.2.2.3.1 beschrieben, mit dem *Micro-FastTrack 2.0 Kit* (Invitrogen) durchgeführt.

Die erhaltene mRNA wurde in 8µl Elutionspuffer aufgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

##### First-Strand cDNA-Synthese

Für die Erststrang-Synthese der cDNA für die Bibliothek wurden die Komponenten des *BD Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit* verwendet. Bei dieser Synthese wird die

Erststrang-cDNA durch die Verwendung spezifischer Oligonukleotide (CDS III Primer und SMART III Oligo) am 5'-und 3'-Ende markiert. Dies ist wichtig für die nachfolgende Amplifikation der cDNA bzw. für die spätere homologe Rekombination der cDNA-Bibliothek *in vivo* in den Vektor (pGADT7-Rec) mit der Gal4-Transaktivierungsdomäne.

In einem sterilen 0,2ml PCR-Gefäß wurde folgender Ansatz gemacht:

2µl mRNA  
1µl 10 µM CDS III Primer [Oligo(dT) Primer]  
1µl ddH<sub>2</sub>O  
Σ 4µl

Dieser Ansatz wurde für 2 Minuten bei 72°C in der PCR-Maschine inkubiert, auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Es wurden folgende Komponenten dazu gegeben:

2µl 5x *First-Strand* Puffer  
1µl 20mM DTT  
1µl 10mM dNTPs  
1µl MMLV-(Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase  
Σ 9µl

Die Komponenten wurden mit der Pipette gemischt und bei 42°C für 10 Minuten in der PCR-Maschine inkubiert. Die anschließende Zugabe von 1µl 10µM SMART III Oligonukleotid erfolgte auf Eis. Die Synthese der Erststrang-cDNA wurde bei 42°C für 1 Stunde durchgeführt, worauf eine Inaktivierung der Reaktion bei 75°C für 10 Minuten und eine Abkühlung des Ansatzes auf Raumtemperatur (25°C) folgte. Im Anschluss wurde 1µl RNaseH (2 Units/µl) zugegeben und 20 Minuten bei 37°C (PCR-Maschine) inkubiert. Die resultierende Einzelstrang-cDNA wurde bei -80°C für die weitere Verwendung aufbewahrt.

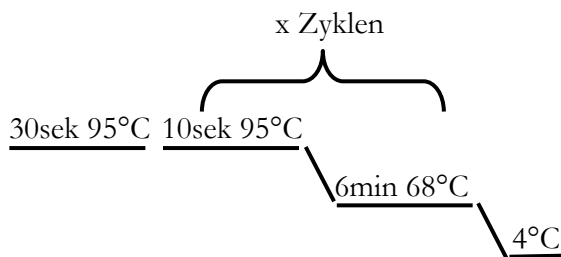
### Bestimmung der optimalen Zyklenzahl für die Amplifikation der Einzelstrang-cDNA

In diesem Schritt wird die generierte Einzelstrang-cDNA (ss cDNA) durch PCR zu einer Doppelstrang-cDNA-Bibliothek amplifiziert. Um eine möglichst heterogene cDNA-Population zu erhalten, muss die optimale Zyklenzahl für die PCR wie folgt, mit den Komponenten des *BD Matchmaker<sup>TM</sup> Library Construction & Screening Kit*, ermittelt werden.

In einem sterilen 0,2ml PCR-Gefäß wurde folgender Ansatz gemischt:

2µl Einzelstrang-cDNA  
70µl ddH<sub>2</sub>O  
10µl 10x Advantage 2 PCR-Puffer  
2µl 50x dNTPs  
2µl 10µM 5' PCR Primer  
2µl 10µM 3' PCR Primer  
10µl 10x GC-Melt Solution  
2µl 50x Advantage 2 Polymerase Mix  
Σ 100µl

Die Komponenten wurden gut gemischt, in eine auf 95°C vorgeheizte PCR-Maschine gestellt und nach folgendem Programm analysiert:



Nach den ersten 15 Zyklen wurde nach der Abkühlung auf 4°C ein 7µl-Aliquot entnommen und auf Eis gestellt. Danach wurde die Reaktion für weitere 3 Zyklen erneut gestartet, wobei die Probe solange auf Eis gehalten wurde, bis die PCR-Maschine wieder eine Temperatur von 95°C erreicht hatte. Diese Prozedur (in 3-Zyklen-Schritten) wurde bis zu einer Gesamtzyklenzahl von 30 bis 33 wiederholt. Die Analyse der gesammelten 7µl-Aliquots bzw. die Ermittlung der optimalen Zyklenzahl für die cDNA-Amplifikation, erfolgte auf einem 1%-igen Agarosegel. Allgemein wird davon ausgegangen, dass durch eine geringere Anzahl von PCR-Zyklen weniger nicht-spezifische PCR-Produkte amplifiziert werden.

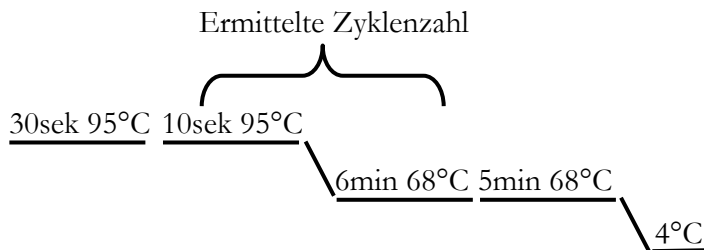
### Amplifikation der Einzelstrang-cDNA

Nach der Ermittlung der optimalen Zyklenzahl wurde die Synthese der Doppelstrang-cDNA-Bibliothek durchgeführt. Dafür wurden die Komponenten, wie oben beschrieben, in gleichen Mengen vereinigt und in eine auf 95°C vorgeheizte PCR-Maschine gestellt. Es wurden immer



Doppelansätze gemacht, die nach der folgenden Aufreinigung der cDNA-Bibliothek vereinigt wurden.

Das verwendete PCR-Programm ist hier dargestellt:



Im Anschluss an die Amplifikation wurde die cDNA-Bibliothek aufgereinigt.

#### Aufreinigung der cDNA-Bibliothek

Die Aufreinigung der gewonnenen cDNA-Bibliothek wurde mit Hilfe von CHROMA SPIN+TE-400 Säulen des *BD Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit* durchgeführt. Durch diese Säulen werden DNA-Fragmente, die kleiner als 200bp sind, entfernt. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die für die Amplifikation der cDNA-Bibliothek angesetzten Doppelansätze (siehe oben) wurden nach der Aufreinigung über die Säule vereinigt. Anschließend folgte die Fällung der cDNA in folgendem Ansatz:

- ~200µl aufgereinigte cDNA-Bibliothek
- 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 4,8
- 2,5 Volumen -20°C 95% Ethanol

Die Fällung wurde mindestens über Nacht bei -20°C durchgeführt. Anschließend wurde die cDNA-Bibliothek bei 13200rpm für 20 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert, für zirka 5 bis 10 Minuten luftgetrocknet und in 20µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Bis zur Verwendung im *yeast-two-hybrid screening* konnte die cDNA-Bibliothek bei -20°C gelagert werden.

#### **2.2.8.4.5 Yeast-two-hybrid screening mittels Ko-Transfektion**

Für das *screening* wurde eine 50ml Übernachtskultur des jeweiligen *bait*-Stammes (T7/*bait*-Protein; siehe auch Materialenteil) in SD-Trp-Selektivmedium angeimpft. Wie unter 2.2.8.4.2 beschrieben, wurden zunächst kompetente Hefezellen dieses *bait*-Stammes in einem Gesamtvolumen von 640µl 1,1x Lithiumacetat/TE (0,1M Lithiumacetat, 10mM TRIS/HCl, 1mM EDTA, pH 7,5) hergestellt.

In einem 15ml Falcon-Röhrchen wurden 20µl der aufgereinigten cDNA-Bibliothek (2.2.8.4.4), 6µl des pGADT7-Rec-Vektors (linearisiert, Clontech) und 20µl, der zuvor für zweimal 5 Minuten bei 100°C denaturierten, *carrier*-DNA (Heringssperma-DNA; 10mg/ml) gemischt. Zu diesem Ansatz wurden 600µl der zuvor hergestellten kompetenten Hefezellen zugegeben und durch vortexen kurz gemischt. Nach der Zugabe von 2,5ml PEG/Lithiumacetat (40% PEG 4000, 0,1M Lithiumacetat, 10mM TRIS/HCl, 1mM EDTA, pH 7,5) wurde erneut kurz durch vortexen gemischt. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 45 Minuten bei 30°C im Brutschrank, wobei die Zellen alle 15 Minuten durch Vortexen gemischt wurden. Danach wurden 160µl DMSO zugegeben, gemischt und für 20 Minuten bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Auch bei dieser Inkubation sollten die Zellen alle 10 Minuten gemischt werden. Durch eine Zentrifugation bei 2200rpm für 5 Minuten (Raumtemperatur) wurden die Zellen niedergeschlagen und nach Abnahme des Überstandes in 3ml YPD Plus Medium (Clontech) resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation für 90 Minuten bei 30°C im Schüttelinkubator (250rpm) erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 2200rpm für 5 Minuten. Der erhaltene Niederschlag wurde in 0,9% Natriumchlorid aufgenommen, wobei das Volumen abhängig von der Anzahl der verwendeten Reporterplatten ist. Es wurde folgendermaßen kalkuliert:

Anzahl der Reporterplatten x 250µl (Volumen, das pro Platte ausplattiert wurde)

Von diesen in 0,9% Natriumchlorid aufgenommenen Zellen wurde desweiteren ein 30µl Aliquot entnommen, zu 720µl 0,9% Natriumchlorid gegeben (1:25 Verdünnung) und auf entsprechende Kontrollplatten ausplattiert. Folgende Selektivplatten (Ø 150mm) wurden für das Screening verwendet:

Kontrollplatten: SD-Trp und SD-Trp-Leu

Reporterplatten: SD-Trp-Leu-Ade-His

Je 250µl transfizierte Zellen wurden auf die Reporterplatten bzw. Kontrollplatten ausplattiert, mit Parafilm verschlossen und mehrere Tage bei 30°C inkubiert.

### Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Effizienz der Transfektion wurde mit Hilfe der SD-Trp-Leu Kontrollplatte ermittelt, durch die die Aufnahme des pGADT7-Rec-Vektors bzw. der *in vivo* mit dem Vektor rekombinierten cDNA-Bibliothek in den transfizierten *bait*-Stamm ersichtlich wird. Dafür wurde zunächst die Gesamtanzahl an erhaltenen Kolonien auf der SD-Trp-Leu-Platte wie folgt ermittelt:

Für die Berechnung der Kolonien pro cm<sup>2</sup> wurden die Kolonien in 5 bis 10 Quadraten (1cm/1cm) ausgezählt und der Mittelwert ermittelt. Dieser Wert wurde auf die Gesamtfläche (A)

der Agarplatte ( $A = \pi \times r^2 = \pi \times [7,5 \text{ cm}]^2 = 176,7 \text{ cm}^2$ ) bezogen, um somit die Gesamtkolonienanzahl zu erhalten.

Die Effizienz wurde folgendermaßen berechnet:

Gesamtanzahl an Kolonien  $\times$  Verdünnungsfaktor  $\times$  3 (da 1/3 der Verdünnung ausplattiert) = Transfektionseffizienz

#### 2.2.8.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

5ml einer Übernachtskultur in Selektivmedium wurden für 5 Minuten bei 3000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 200 $\mu$ l Lysis-Puffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM TRIS/HCl pH 8,0) resuspendiert und zu etwa 300mg Glasperlen ( $\varnothing$  425-600 $\mu$ m, *acid washed*) gegeben. Anschließend wurden 200 $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und 5 Minuten auf dem Vortex-Schüttler bei maximaler Frequenz und Raumtemperatur geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13200rpm für 10 Minuten und 4°C, wonach die obere wässrige Phase (zirka 150 $\mu$ l) abgenommen und in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Diese wurde im Anschluss erneut mit 200 $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und für weitere 10 Minuten zentrifugiert. Die abgenommene obere, wässrige Phase wurde danach mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 4,8) und mit dem 2,5-fachen Volumen, auf -20°C vorgekühltem, 100% Ethanol versetzt. Die DNA-Präzipitation fand durch Inkubation bei -20°C über Nacht (oder länger) statt. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 13200rpm und 4°C zentrifugiert und das Präzipitat zweimal mit 70% Ethanol (vorgekühlt bei -20°C) gewaschen. Der DNA-Niederschlag wurde getrocknet und in 8 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Ein 5 $\mu$ l-Aliquot davon wurde zur Transformation von *E. coli* (2.2.1.1.4) eingesetzt und eine präparative Plasmid-Isolierung (2.2.2.1.1) aus einer rekombinanten Kolonie durchgeführt.

#### 2.2.8.4.7 Analyse direkter Protein-Protein-Interaktionen mit dem *Two-hybrid*-System

##### Konstruktion der *prey*-Plasmide

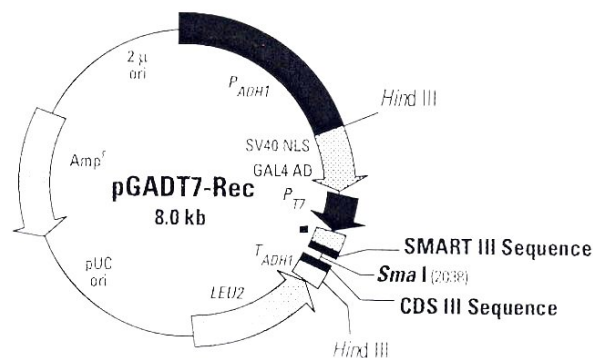
Zur Konstruktion der *prey*-Plasmide wurde der linearisierte pGADT7-Rec-Vektor (*BD Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit*, Clontech) zunächst ligiert und in *E. coli* transformiert.

Der in Abbildung 2.3 dargestellte pGADT7-Rec-Vektor exprimiert das zu untersuchende Protein als eine Fusion mit der Gal4- Aktivierungsdomäne (Gal4 AD). Die Transkription wird von dem konstitutiven *ADH1*-Promotor ( $P_{ADH1}$ ) initiiert bzw. an dem *ADH1* Stoppsignal ( $T_{ADH1}$ ) beendet. Die Gal4-Aktivierungsdomäne enthält das virale SV40 *nuclear localization signal* (SV40 NLS), das

den Transport der Fusionsproteine in den Zellkern der Hefe gewährleistet. Durch den vorhandenen Hämagglutinin (HA)-tag können die Gal4-AD-Fusionsproteine mittels Antikörper detektiert werden. Durch den zusätzlichen T7-Promotor besteht die Möglichkeit, die mit Hämagglutinin fusionierten Proteine *in vitro* zu transkribieren und translatieren.

pGADT7-Rec repliziert sich unabhängig in *E. coli* sowie in *S. cerevisiae* und enthält für die Selektion in *E. coli* die Ampicillin-Kassette bzw. den *LEU2*-Marker für die Selektion in *S. cerevisiae*.

Zur Konstruktion der Fusionsproteine Gal4-AD und der *prey*-Proteine wurden die einmaligen Restriktionsschnittstellen der Enzyme *EcoRI* und *BamHI* verwendet, die sich vor der SMART III-Sequenz bzw. nach der CDS III-Sequenz befinden. Diese befinden sich im gleichen Leserahmen mit dem 3'-Ende der Gal4-Aktivierungsdomäne.



**Abb.2.3: Restriktionskarte von pGADT7-Rec.** Der Vektor exprimiert Proteine in *S. cerevisiae*, die an die Gal4-Aktivierungsdomäne (Gal4-AD) fusioniert werden. Er wird sowohl zur Konstruktion der *prey*-Fusionsproteine im *yeast-two-hybrid*-System (durch homologe Rekombination mit der cDNA-Bibliothek), als auch zur Analyse von direkten Interaktionen zwischen zwei bekannten Proteinen verwendet.

### Direkte Protein-Protein-Interaktion

Um die Interaktion von zwei bekannten Proteinen bzw. Proteindomänen zu untersuchen wurde von dem jeweiligen *bait*-Hefestamm eine Übernachtskultur angimpft und das *prey*-Konstrukt am darauffolgenden Tag, mittels der unter 2.2.8.4.2 beschriebenen Lithiumacetat-Methode, in diesen Stamm transfiziert.

Die Hefezellen wurden anschließend auf folgende Selektivplatten (Ø 94mm) ausgestrichen (je 100µl) und bei 30°C mehrere Tage inkubiert:

Kontrollplatten: SD-Trp-Leu

Reportergenplatten: SD-Trp-Leu-Ade-His

### 2.2.8.5 Proteinüberexpression

#### 2.2.8.5.1 Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* (*small-scale*)

Bei der *small-scale* Überexpression von Proteinen werden die optimalen Bedingungen im Bezug auf die IPTG-Konzentration, die Temperatur und die Zeitspanne für die Expression eines spezifischen Konstrukts ermittelt. Dies wird in kleinen Volumina durchgeführt (*small-scale*). Für die Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Überexpression wurden die Konstrukte und der Vektor in *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL-Zellen transformiert (2.2.1.1.4). Von den erhaltenen Kolonien wurden jeweils Flüssigkulturen (5ml) mit den entsprechenden Antibiotika (Chloramphenicol, Tetracyclin und Ampicillin) angeimpft und über Nacht bei 37°C inokuliert. Am darauffolgenden Tag wurde die optische Dichte der Kulturen gemessen und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1-0,2 in einem Gesamtvolumen von 20 bis 25ml eingestellt. Das dafür verwendete LB-Medium enthielt als einziges Antibiotikum Ampicillin. Die Kulturen wurden bei der zu untersuchenden Temperatur (30°C, 37°C) geschüttelt, bis sie eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreicht hatten. Dann erfolgte die Induktion durch die Zugabe von IPTG in den Test-Konzentrationen von 0,1-1mM. Vor der Induktion wurde den Kulturen jeweils 1ml als Null-Wert entnommen und bei 13200rpm für 5 Minuten (4°C) abzentrifugiert. Parallel dazu wurde ein Aliquot für die Bestimmung der OD<sub>600</sub> entnommen. Nach der Induktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten erneut ein Aliquot von 1ml entnommen (30 Minuten bis zu 4 Stunden nach der Induktion) und wie oben sedimentiert bzw. ein Aliquot für die Bestimmung der optischen Dichte verwendet. Die Bakterien-Niederschläge wurden anschließend in folgendem Verhältnis in 2x SDS-Puffer resuspendiert:

100µl 2x SDS-Puffer/OD<sub>600</sub> von 0,5.

Nun konnte die Überexpression auf einem SDS-Gel untersucht werden.

#### 2.2.8.5.2 Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen in *E. coli* (*large-scale*)

Für die Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurden *E. coli* BL21-CodonPlusRIPL-Zellen verwendet. Direkt vor der Überexpression wurden die Zellen mit dem Konstrukt bzw. dem Vektor transformiert (2.2.1.1.4). Die Kolonien wurden mit LB-Medium, das Ampicillin enthielt, direkt von der Agar-Platte in einen Kolben gespült und in einem Gesamtvolumen von 200ml über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde eine OD<sub>600</sub> von 0,3 in einem Gesamtvolumen von 400ml mit LB-Medium eingestellt und bei der unter 2.2.8.5.1 ermittelten optimalen Temperatur für die Überexpression inkubiert. Vor der Induktion bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 mit der optimalen IPTG-Konzentration wurde der Null-Wert (1ml der

jeweiligen Kultur) entnommen und abzentrifugiert. Nach der unter 2.2.8.5.1 bestimmten Zeitspanne der Induktion wurden von den jeweiligen Kulturen Aliquots für die Bestimmung der optischen Dichte und für die Analyse auf einem SDS-Gel entnommen. Desweiteren wurden die Kulturen in 50ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt, bei 4000rpm für 15 Minuten (4°C) abzentrifugiert und für die weitere Aufreinigung verwendet.

Zur Aufreinigung des überexprimierten GST-Fusionsprotein bzw. GST wurden die Bakterien zunächst in 20ml Lysis-Puffer (20mM TRIS pH 7,5, 100mM KCl, 1mM DTT, 1x Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Nach der Zugabe von 1µl Lysozym pro 100µl Zellsuspension folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Zum Aufschließen der Zellen wurden diese einem dreimaligen Einfrier-/Auftau-Zyklus unterzogen, wobei die Zellen 10 Sekunden in Flüssigstickstoff inkubiert und anschließend kurz bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Desweiteren folgte eine Behandlung der Bakterienzellen mit dem *Sonifier* (Stufe 8; volumenabhängig) für 5 bis 6 Zyklen von je 10 Sekunden. Zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Proben für 2 Minuten auf Eis bzw. die Spitze des *Sonifiers* mit Eiswasser abgekühlt. Es musste darauf geachtet werden, dass die Proben nicht zu heiß werden und sich zuviel Schaum bildet (Gefahr der Proteindenaturierung). Anschließend wurde das Lysat bei 12000rpm für 45 Minuten (4°C) abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Ein 10µl Aliquot des Überstandes wurde für die Analyse auf einem SDS-Gel bei -20°C eingefroren.

Es folgte die Aufreinigung des Überstandes bzw. des Fusionsproteins über die Glutathion-Sepharose Säule (*Bulk GST Purification Module Kit*). Dabei bindet das GST-Fusionsprotein an das, über Sepharose immobilisierte, reduzierte Glutathion. Die Aufreinigung fand bei 4°C (Kühlraum) statt. Zunächst wurden die Säulen nach Herstellerangaben vorbereitet. Zur Aufreinigung eines Kulturvolumens von 400ml wurden 200µl 100%-ige Glutathion-Sepharose 4B benötigt. Da diese 75%-ig vorliegt, wurde angegeben, 1,33ml 75%-ige Glutathion-Sepharose 4B pro ml benötigtem Säulenvolumen (200µl) einzusetzen. Die Säulen wurden mit 266µl Glutathion-Sepharose 4B gepackt und bis zum Absetzen dieser stehen gelassen (Durchfluss verschlossen). Es musste darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen im Säulenmaterial befinden. Die Säulen wurden zweimal mit 2ml kaltem 1x PBS gewaschen (10ml 1x PBS pro 1,33ml Glutathion-Sepharose 4B) und anschließend die Bakterienlysate nach und nach über die Säulen gegeben. Danach wurde die Matrix jeweils dreimal mit 2,6ml 1x PBS gewaschen (10 Säulenvolumen an 1x PBS).

Die Elution der Fusionsproteine fand bei Raumtemperatur statt. Dazu wurde den Säulen zunächst der Durchfluss verschlossen. Nach der Zugabe von jeweils 266µl Glutathion-Elutions-

Puffer (1ml Elutionspuffer pro ml Säulenvolumen) folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Öffnen des Durchflusses wurde das Eluat aufgefangen. Dieser Elutionsschritt wurde dreimal wiederholt und zwischen den einzelnen Elutionen wurden die Säulen erneut 10 Minuten mit dem Puffer inkubiert. Anschließend wurden die 4 Eluate vereinigt und bei -20°C bis zur Analyse auf einem SDS-Gel gelagert.

Die Glutathion-Sepharose 4B Matrix wurde nach Angaben des Herstellers regeneriert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung eines neuen Mitglieds der TRAP-Proteinfamilie in *Plasmodium*

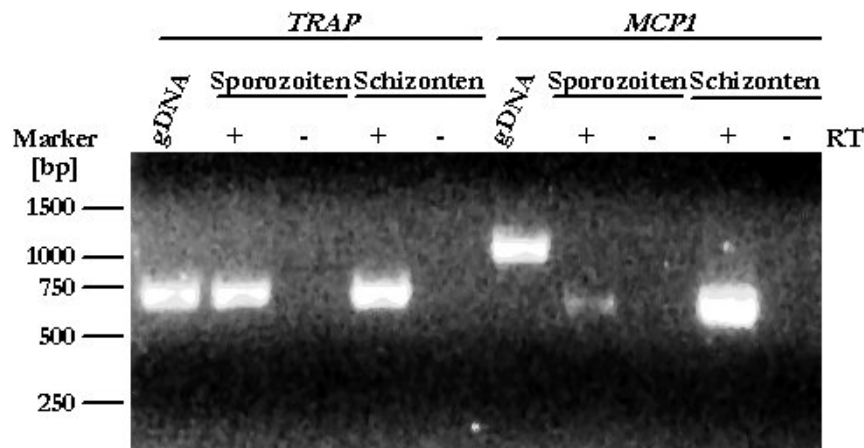
Proteine der TRAP-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Fortbewegung und Invasion verschiedener *Plasmodium*-Stadien, bzw. anderen Parasiten des Phylums *Apicomplexa*, in die jeweilige Wirtszelle. Durch genetische Studien konnte gezeigt werden, dass in *Plasmodium* Sporozoiten das TRAP-Protein (*thrombospondin-related anonymous protein*) sowohl für die Infektion der Speicheldrüsen im Moskito-Vektor als auch für die Infektion der Hepatozyten im Säugetier-Wirt essentiell ist. Desweiteren spielt TRAP eine wichtige Rolle bei der Gleitbewegung (*gliding motility*) der Speicheldrüsen-Sporozoiten (Sultan *et al.*, 1997).

Aufgrund der kontroversen Diskussion in der Literatur über die Expression von TRAP in Blutstadien (Robson *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 1992; Cowan *et al.*, 1992; Robson *et al.*, 1995) wurde diese zunächst auf mRNA- und Proteinebene in *Plasmodium berghei* analysiert.

##### 3.1.1. Analyse der TRAP-Expression während des *Plasmodium berghei*-Lebenszyklus

Um die Expression von TRAP in verschiedenen Stadien des *Plasmodium berghei*-Lebenszyklus auf Transkript-Ebene zu untersuchen, wurde zunächst mRNA sowohl aus Speicheldrüsen-Sporozoiten ( $4 \times 10^5$  Sporozoiten) als auch aus, mittels Gradienten-Zentrifugation angereicherten, Schizonten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis von *TRAP*-Transkripten erfolgte durch eine anschließende PCR-Analyse mit Hilfe der gen-spezifischen Oligonukleotide *Pb TRAP for/amber4 rev*, die ein zirka 700bp-Fragment aus dem Gen amplifizieren. Als Expressions-Kontrolle wurde das beschriebene Blutstadien-Protein MCP1 (*merozoite capping protein1*; Klotz *et al.*, 1989) verwendet, das auch in Speicheldrüsen-Sporozoiten nachgewiesen werden konnte (Matuschewski *et al.*, 2002a). Dafür wurden die Primer *Pb mcp1for/Pb mcp1rev* verwendet, durch die im Falle von gDNA ein zirka 1072bp-Fragment bzw. bei cDNA ein zirka 600bp-Fragment amplifiziert wird. Hierbei konnten *TRAP*-Transkripte sowohl in Speicheldrüsen-Sporozoiten als auch in Schizonten nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Die Kontrolle ergab eine deutliche Expression von *MCP1* in den analysierten späten Blutstadien, wohingegen die Expression in Speicheldrüsen-Sporozoiten reduziert ist. Die hier gezeigte Reduktion ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass unterschiedliche Mengen an Ausgangsmaterial für die mRNA-Isolation aus Sporozoiten bzw. Schizonten verwendet wurde,





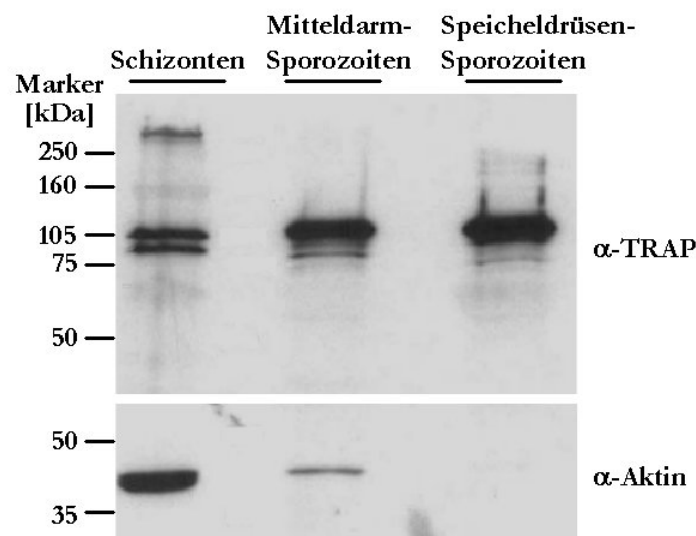
**Abb.3.1: Expression von *TRAP* in Speicheldrüsen-Sporozoiten und Schizonten.** RT-PCR von PolyA<sup>+</sup>-RNA von *P. berghei*-Speicheldrüsen-Sporozoiten (4x10<sup>5</sup>) und Schizonten mit gen-spezifischen Oligonukleotiden für *TRAP* und *MCP1* als Kontrolle. *TRAP* ist in beiden analysierten Stadien exprimiert. Abkürzungen: gDNA (genomische DNA von *P. berghei* NK65), RT (Reverse Transkriptase), *TRAP* (*thrombospondin-related anonymous protein*), *MCP1* (*merozoite capping protein1*), + (cDNA-Synthese mit RT), - (cDNA-Synthese ohne RT).

da eine Angleichung hier praktisch nicht oder schwer möglich ist. Um die Expression von *TRAP* in Blutstadien auf Protein-Ebene zu bestätigen, wurden die Proteinextrakte von jeweils 10<sup>5</sup> Mitteldarm-Sporozoiten bzw. Speicheldrüsen-Sporozoiten und einem Aliquot eines durch Gradienten-Zentrifugation angereicherten Schizonten-Niederschlags mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran analysiert. Mit Hilfe eines *TRAP*-Antikörpers gegen die extrazelluläre *repeat*-Domäne (Abbildung 1.3) konnte das Protein sowohl in den beiden Sporozoiten-Stadien als auch im Schizonten-Stadium detektiert werden (Abbildung 3.2).

Die bei Schizonten deutlich detektierbare Doppelbande weist auf eine mögliche Prozessierung des Proteins hin, die auch für Speicheldrüsen-Sporozoiten beschrieben werden konnte (Kappe *et al.*, 1999; Bhanot *et al.*, 2003; Silvie *et al.*, 2004). Es wird davon ausgegangen das die *TRAP*-Prozessierung bei Speicheldrüsen-Sporozoiten ein, durch eine parasiten-eigene Protease, vermittelter Prozess ist (Silvie *et al.*, 2004).

Als Ladekontrolle wurde bei dieser Western-Blot-Analyse die Expression von Aktin herangezogen (Abbildung 3.2). *Plasmodium* besitzt zwei Isoformen von Aktin, Aktin1 und Aktin2 (Schüler *et al.*, 2005), wobei Aktin1 während des gesamten Lebenszyklus bzw. Aktin2 nur in den Gametozyten-Stadien exprimiert wird. Der verwendete Aktin-Antikörper ist gegen die C-terminale Region des Proteins gerichtet, die zwischen beinahe allen Aktin-Molekülen konserviert ist. Durch diesen Antikörper wird das 42kDa Protein detektiert. Interessanterweise wurde nur

eine sehr schwache Aktin-Expression in Mitteldarm-Sporozoiten detektiert, wohingegen Speicheldrüsen-Sporozoiten Aktin überhaupt nicht exprimierten. Da von den Sporozoitenextrakten gleiche Mengen ( $10^5$  Sporozoiten) auf das SDS-Gel geladen wurden, können diesbezügliche Unterschiede ausgeschlossen werden. Möglicherweise wird Aktin in den verschiedenen Parasiten-Stadien differentiell exprimiert oder eine noch nicht beschriebene weitere Isoform des Proteins übernimmt die Funktion in Sporozoiten. Diese Beobachtung ist sehr interessant und sollte (an anderer Stelle) weiter untersucht und diskutiert werden.



**Abb.3.2: Protein-Expression von TRAP in Blutstadien.** Proteinextrakte von jeweils  $10^5$  Mitteldarm- bzw. Speicheldrüsen-Sporozoiten und ein Aliquot eines Schizonten-Niederschlags wurden auf einem SDS-Gel (10%) separiert und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen  $\alpha$ -TRAP *repeat* Antikörper (1:3000). Als Ladekontrolle wurde die Membran anschließend mit einem polyklonalen  $\alpha$ -Aktin Antikörper (1:2000) inkubiert.

Die hier gezeigte Expression des Sporozoiten-Invasins TRAP in Blutstadien wirft die Frage nach einer möglichen Funktion dieses Proteins auch in den erythrozytären Stadien auf. Dabei kann eine essentielle Funktion ausgeschlossen werden, da Parasiten, bei denen das Gen ausgeschaltet wurde, sowohl eine normale Invasion in Erythrozyten als auch eine normale Entwicklung während des Blutstadienzyklus zeigen (Sultan *et al.*, 1997).

Das Protein, welches für die Invasion von Merozoiten in die roten Blutkörperchen verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Jedoch konnten einige Proteine, die wahrscheinlich bei der Invasion von Merozoiten in Erythrozyten eine Rolle spielen,

beschrieben werden (Gaur *et al.*, 2004). Allerdings konnte keinem dieser Proteine eine direkte Funktion während des Invasions-Prozesses zugeschrieben werden.

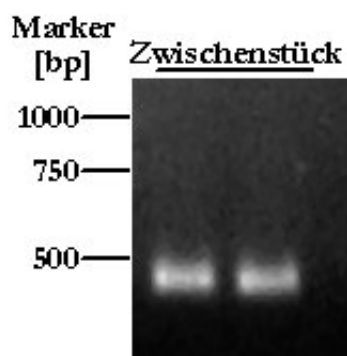
Für das Sporozoiten-Invasin TRAP konnte hier eine Expression in den erythrozytären Stadien nachgewiesen werden, allerdings ist die Funktion, bzw. ob es in diesem Parasitenstadium überhaupt eine Funktion hat, noch unklar. Basierend auf dieser Beobachtung wurde nach weiteren Kandidaten gesucht, die Charakteristika von Proteinen der TRAP-Familie besitzen.

### 3.1.2 Das *Plasmodium*-Genom enthält ein weiteres TRAP-ähnliches Protein

Durch Sequenzanalysen in der *Plasmodium falciparum*-Genomdatenbank (Gardner *et al.*, 2002) konnte ein Gen identifiziert werden, das Homologien zu den beschriebenen TRAP-Familien-Mitgliedern, dem Sporozoiten-Invasin TRAP und dem Ookineten-Invasin CTRP, zeigt. Hierbei wurde in der Datenbank mit der A-Domäne von TRAP nach weiteren Kandidaten gesucht.

Dieses neue Protein/Transkript wurde als TLP1, für *TRAP-like protein1*, bezeichnet.

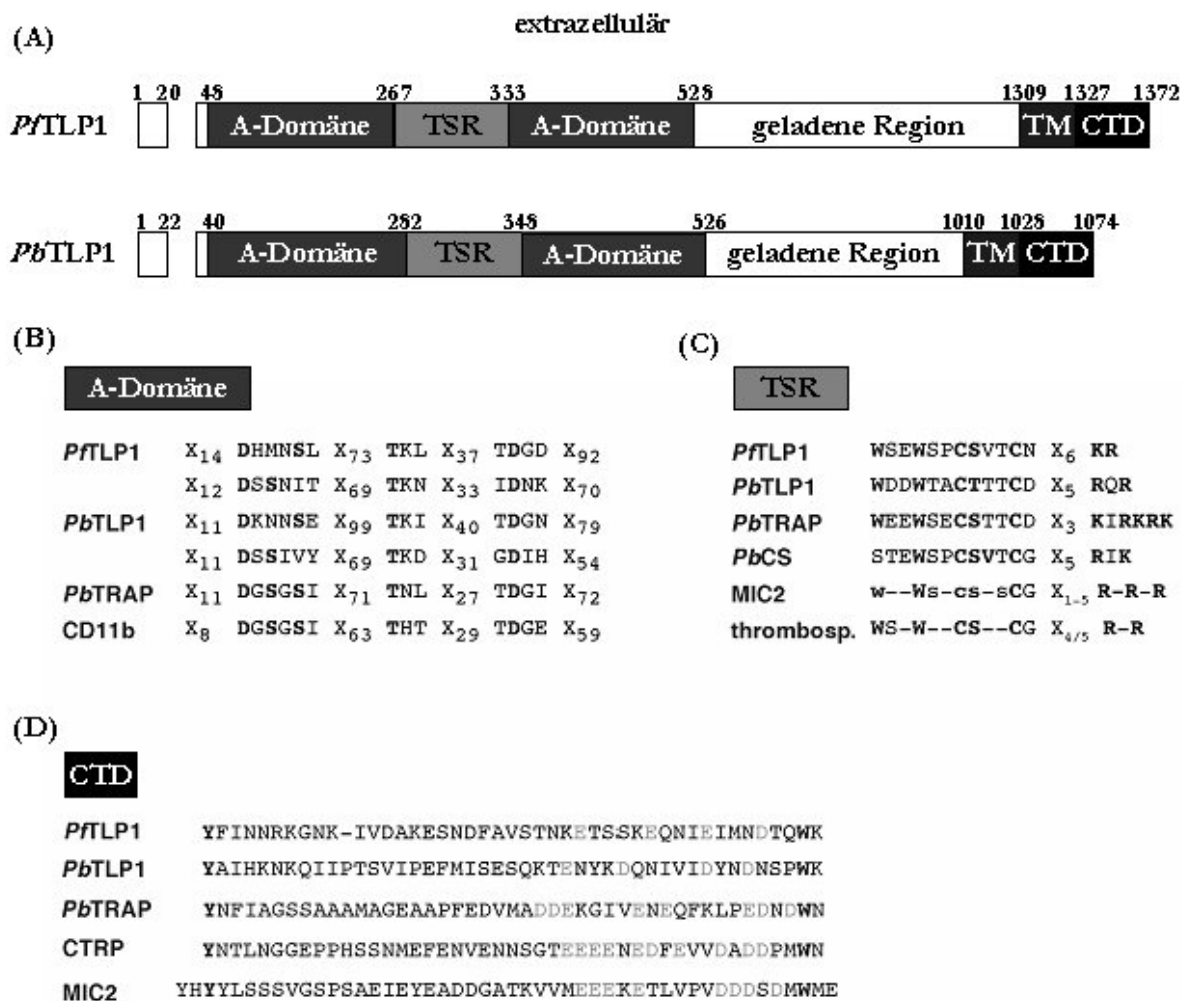
Die in der *P. falciparum*-Datenbank entdeckte Sequenz wurde zunächst dazu verwendet, um das Ortholog in *P. berghei* zu suchen. Dabei wurden zwei Sequenzabschnitte (*contigs*) gefunden, bei dem das eine das Startkodon und das andere das Stoppkodon enthielt. Um sicher zu gehen, dass die vollständige Sequenz vorliegt bzw. um ein eventuell fehlendes Zwischenstück zu identifizieren, wurden Oligonukleotide gewählt, die das jeweilige Ende des *contigs* mit dem Startkodon bzw. den Anfang des *contigs* mit dem Stoppkodon flankierten. In der nachfolgenden PCR mit genomischer DNA von *P. berghei* konnte mit den Oligonukleotiden *Pb tlp1zwfor*/*Pb tlp1zwrev* ein zirka 450bp-Fragment amplifiziert werden (Abbildung 3.3), das im Weiteren aufgereinigt und für die Sequenzierung mit den Standardprimern M13-RP und M13-FP in den Vektor pUC19 kloniert wurde.



**Abb.3.3: PCR-Amplifikation des Zwischenstücks der identifizierten *P. berghei* TLP1-*contigs*.** Die PCR wurde mit gDNA von *P. berghei* und den Primern *Pb tlp1zwfor*/*Pb tlp1zwrev* durchgeführt. Die erhaltenen Fragmente wurden aufgereinigt, vereinigt und zur Sequenzierung in den Vektor pUC19 kloniert.

Mit den durch die Sequenzierung zusätzlich erhaltenen 71 Nukleotiden konnte die Sequenz von *P. berghei* TLP1 vervollständigt und an die *GenBank*<sup>TM</sup>-Datenbank übermittelt werden (*Accession*

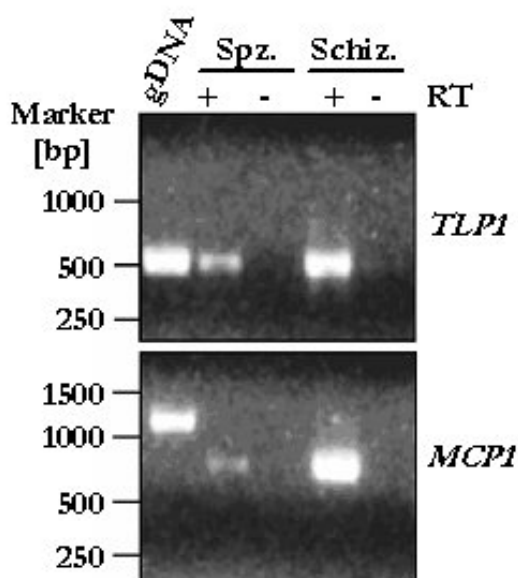
Number AY484471). Mit Hilfe der nun vorliegenden Sequenzinformation konnte die Proteinstruktur von *Pf*TLP1 und *Pb*TLP1 dargestellt (Abbildung 3.4) und mit weiteren Mitgliedern der TRAP-Familie verglichen werden. Dabei ist auffällig, dass TLP1 in seiner Proteinstruktur eine große Ähnlichkeit zu TRAP (Abbildung 1.X) aufzeigt. TLP1 ist ein TypI-Transmembranprotein, dessen extrazellulärer Bereich zwei A-Domänen (Girma *et al.*, 1987; Whittacker und Hynes, 2002) besitzt, die durch einen *thrombospondin typeI repeat* (TSR; Lawler und Hynes, 1986; Tucker, 2004) getrennt werden. A-Domänen sind in vielen Proteinen zu finden, die an Zell-Zell-, Zell-Matrix- und Matrix-Matrix-Interaktionen beteiligt sind. Diese Domänen besitzen Metall-Bindungsstellen, die als MIDAS-Motive (*metal ion-dependent adhesion site*) bezeichnet werden und an der Bindung von Liganden beteiligt sind. Von den fünf für das MIDAS-Motiv charakteristischen Resten, die das zentrale divalente Kation koordinieren, sind bei TLP1 die beiden flankierenden Aspartat-Reste und das zentrale Threonin konserviert (Abbildung 3.4(B)). Allerdings ist bei TLP1 nur einer der im allgemeinen zwei Serin-Reste in der DxSxS Sequenz vorhanden. Die TSRs enthalten generell zwei konservierte Motive, die auch in dem TSR von TLP1 zu finden sind. Zum einen handelt es sich dabei um ein N-terminales WSxW Tetrapeptid und zum anderen um eine C-terminale Anhäufung von basischen Resten (Abbildung 3.4(C)), die durch zwei charakteristische Cystein-Reste von dem Tetrapeptid getrennt werden. Diese Motive sind dabei an der Bindung von Heparin bzw. von sulfatierten Glykokonjugaten beteiligt (Guo *et al.*, 1992; Sinnis *et al.*, 1994; Robson *et al.*, 1995). Die adhäsiven Domänen werden durch eine sogenannte „geladene Region“ von der Transmembrandomäne getrennt. Hier ist eine Anhäufung von Lysin-, Arginin-, Glutamat- und Aspartat-Resten zu finden. Die zytoplasmatische Domäne von TLP1 enthält das innerhalb der TRAP-Familie konservierte Tryptophan bzw. die Anhäufung negativ geladener Reste (Abbildung 3.4(D)). Es konnte gezeigt werden, dass diese charakteristischen Aminosäure-Reste bei TRAP essentiell für die Bewegung und Invasion des Parasiten sind (Kappe *et al.*, 1999). Im N-terminalen Bereich der zytoplasmatischen Domäne ist außerdem das Tyrosin konserviert, das im Falle von TRAP, in den Transport des Proteins in die sekretorischen Vesikel und an die Zelloberfläche involviert ist (Bhanot *et al.*, 2003). Im Hinblick auf die Proteinstruktur besitzt TLP1 die charakteristischen Merkmale von Proteinen der TRAP-Familie.



**Abb.3.4: Schematische Darstellung der Proteinstruktur und Domänen von *P. falciparum* und *P. berghei* TLP1.** (A) Gegenüberstellung der Primärstruktur von *Pf*TLP1 und *Pb* TLP1. Gezeigt sind die extrazellulären Domänen, die von Willebrand A-Domänen, der TSR (*thrombospondin typeI repeat*) und eine durch Anhäufung von geladenen Aminosäuren gekennzeichnete Region (geladene Region). Im Anschluss an die Transmembrandomäne (TM) folgt eine kurze zytoplasmatische Domäne (CTD; *cytoplasmic tail domain*). (B) Vergleich der in A-Domänen vorhandenen MIDAS-Motive unterschiedlicher Proteine. Dargestellt sind die Motive von TLP1, TRAP und dem Integrin CD11b. Die Aminosäure-Reste, die an der Koordination des divalenten Kations beteiligt sind, sind in schwarz dargestellt. (C) Vergleich des *thrombospondin typeI repeats* (TSR) in verschiedenen Proteinen mit TSR-Domänen. Gegenübergestellt sind die entsprechenden Sequenzen der Proteine *Pf*TLP1 und *Pb* TLP1, *Pb* TRAP, *Pb* CS (*circumsporozoite protein*), *Tg* MIC2 (*T. gondii micronemal protein2*) und des humanen Thrombospondins. (D) Die zytoplasmatische Domäne (CTD) von TLP1 besitzt die charakteristischen Merkmale der intrazellulären Domänen von Proteinen der TRAP-Familie. Gezeigt ist ein Aminosäuren-Vergleich der zytoplasmatischen Domänen der Proteine *Pf*TLP1 und *Pb* TLP1, *Pb* TRAP, *Pf*CTRP und *Tg* MIC2. Die konservierten Aminosäuren Tyrosin im N-terminalen Bereich und Tryptophan im C-terminalen Bereich der Domäne sind in schwarz bzw. die Carboxy-terminalen sauren Aminosäuren in grau dargestellt.

### 3.1.3 TLP1 ist in den erythrozytären Stadien von *Plasmodium* exprimiert

Für die Analyse der Transkription des *TLP1*-Gens wurde mRNA aus *Pb* Speicheldrüsen-Sporozoiten und durch Gradienten-Zentrifugation aufgereinigte *Pb* Schizonten isoliert. Diese wurde daraufhin in cDNA umgeschrieben und für die folgende RT-PCR mit den gen-spezifischen Primern *Pb tlp1*for3/*Pb tlp1*rev4 eingesetzt, durch die ein zirka 429bp-Fragment amplifiziert wird. Als Kontrolle wurde, wie unter 3.1.1 beschrieben, das in Blutstadien exprimierte *MCP1*-Gen verwendet. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt, konnten *TLP1*-Transkripte in Schizonten und in Speicheldrüsen-Sporozoiten nachgewiesen werden. Ein quantitativer Vergleich der Gen-Expression in den beiden analysierten Stadien ist nicht möglich, da, wie unter 3.1.1 erläutert, unterschiedliche Mengen an Ausgangsmaterial für die mRNA-Isolierung vorlag. Interessanterweise konnte hier ein TRAP-ähnliches Protein in Blutstadien detektiert werden und um diese Beobachtung weiter zu verfolgen, wurde zunächst ein Antikörper gegen TLP1 hergestellt.



**Abb.3.5: Transkription von *TLP1* in *Pb***

**Sporozoiten und *Pb* Schizonten.** Gezeigt ist die RT-PCR von *P. berghei* polyA<sup>+</sup>-RNA aus Speicheldrüsen-Sporozoiten und aus durch Gradienten-Zentrifugation aufgereinigten Schizonten. Es wurden gen-spezifische Primer für *TLP1* und *MCP1* als Kontrolle verwendet. Abkürzungen: gDNA (genomische DNA von *P. berghei* NK65), Spz (*Pb* Speicheldrüsen-Sporozoiten); Schiz (*Pb* Schizonten), RT (Reverse Transkriptase), + (cDNA-Synthese mit RT), - (cDNA-Synthese ohne RT), *MCP1* (*merozoite capping protein 1*), *TLP1* (*TRAP-like protein 1*).

### 3.1.4 Herstellung eines *Plasmodium berghei* TLP1-Antiserums

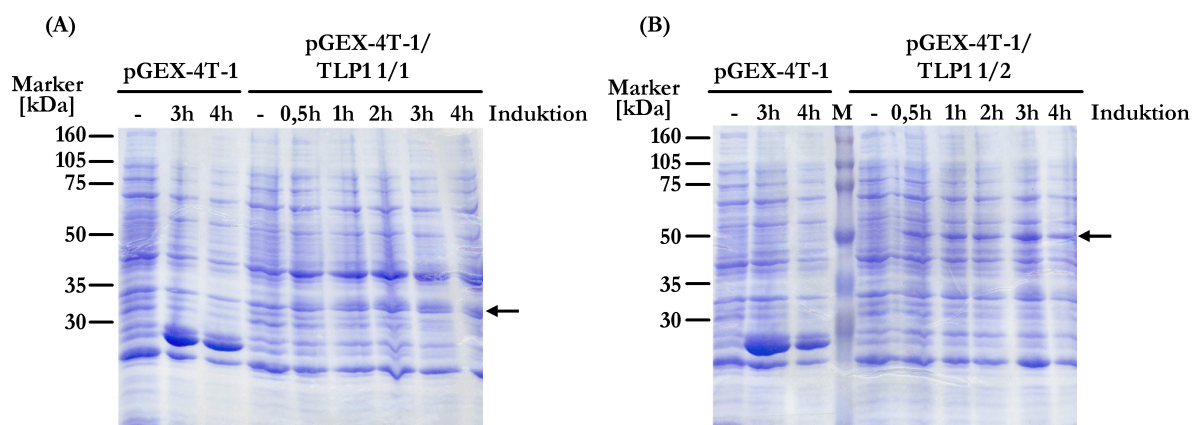
#### 3.1.4.1 Konstruktion der Überexpressionskonstrukte

Für die Herstellung eines Antikörpers wurden jeweils zwei TLP1-Fragmente zur Überexpression als GST-Fusion in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert. Dazu wurden durch die Verwendung der Primer-Kombinationen, *Pb tlp1* overexp for/*Pb tlp1* overexp rev1 und *Pb tlp1* overexp for/*Pb tlp1* overexp rev2, ein zirka 362bp- bzw. ein 602bp-Fragment aus der geladenen Region des Proteins

durch PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit den jeweiligen Enzymen (*EcoRI* und *NotI*) geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektor pGEX-4T-1 ligiert. Aus diesen Klonierungen wurden die Plasmide pGEX-4T-1/TLP1 1/1 und pGEX-4T-1/TLP1 1/2 isoliert.

### 3.1.4.2 Ergebnisse aus den Test-Experimenten

In *small-scale*-Experimenten wurden die Bedingungen für die Überexpression der Konstrukte optimiert. Dafür wurden diese und der Vektor jeweils in BL21-CodonPlus-RIL-Zellen transformiert und die Expression der GST-Fusionen bei verschiedenen Temperaturen bzw. IPTG-Konzentrationen getestet. Dazu wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten aus der Bakterienkultur entnommen und die gewonnenen Extrakte auf einem SDS-Gel analysiert. Abbildung 3.6 zeigt einen Vergleich der beiden Konstrukte bei einer Überexpressionstemperatur von 37°C und einer IPTG-Konzentration von 1mM über einen Zeitraum von 4 Stunden. Unter diesen Bedingungen wurde das kürzere Fusionsprotein, das ein errechnetes Molekulargewicht von zirka 40kDa besitzt, nur schwach exprimiert (Abbildung 3.6(A)). Allerdings konnte die GST/TLP1 1/2-Fusion (zirka 48kDa) unter diesen Versuchsbedingungen deutlich überexprimiert werden, wobei ein Maximum nach 3 Stunden erreicht wurde (Abbildung 3.6(B)). Als Expressionskontrolle wurde der Vektor parallel zu den Fusionsproteinen analysiert. Unter den gewählten Versuchsbedingungen zeigte das GST-Protein (26kDa) eine starke Expression.



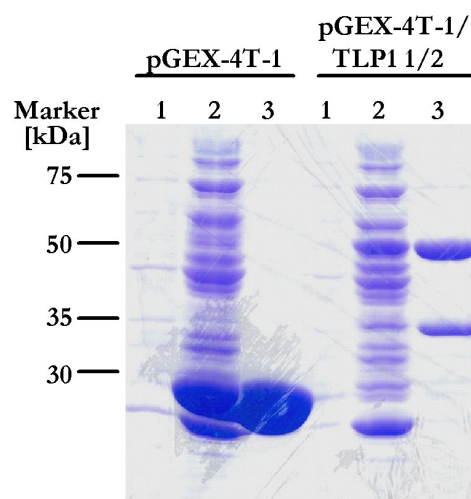
**Abb.3.6: Optimierung der Expressionsbedingungen für pGEX-4T-1/TLP1 1/1 und pGEX-4T-1/TLP1 1/2.** Die Expression der GST-Fusionen und des GST-Proteins wurde bei einer IPTG-Konzentration von 1mM induziert und bei 37°C über einen Zeitraum von 4 Stunden durchgeführt. Die zu den angegebenen Zeitpunkten abgenommenen Proben wurden auf einem 10%-igen SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie angefärbt. Die Pfeile zeigen die induzierten Fusionsproteine. **(A)** pGEX-4T-1/TLP1 1/1-Expression. **(B)** pGEX-4T-1/TLP1 1/2-Expression. Abkürzungen: M (Marker); h (Stunden).

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde für die weiteren Experimente die GST-TLP1 1/2-Fusion weiter verfolgt und versucht, die Bedingungen weiter zu optimieren. Allerdings konnte durch die anderen getesteten Temperaturen bzw. IPTG-Konzentrationen keine deutliche Veränderung in der Expression der Fusion erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Die folgende Überexpression in großem Maßstab (*large-scale*) für die Aufreinigung der GST-TLP1 1/2-Fusion wurde deshalb bei 37°C und einer IPTG-Konzentration von 1mM für 3 Stunden durchgeführt.

### 3.1.4.3 Aufreinigung der überexprimierten GST-TLP1-Fusion

Die Überexpression der GST-TLP1 1/2-Fusion für die anschließende Aufreinigung wurde in BL21-CodonPlus-RIPL-Zellen durchgeführt. Die Expression wurde mit 1mM IPTG induziert und bei 37°C für 3 Stunden durchgeführt. Der aufgeschlossene Zellschlag wurde über eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgereinigt und das Protein als GST-Fusion von der Säule eluiert. Zur Analyse der erfolgten Aufreinigung wurden Aliquots vor der Induktion, vor der Säule und nach der Elution entnommen und auf ein SDS-Gel geladen (Abbildung 3.7). Durch die Verwendung der Glutathion-Sepharose-Säule konnte eine deutliche Aufreinigung des GST-TLP1 1/2 Lysats erzielt werden. Das Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von zirka 48kDa. Bei zirka 35kDa ist eine zusätzlich prominente Protein-Bande zu erkennen, bei der es sich womöglich um ein Abbauprodukt des Fusionsproteins handelt. Außerdem sind weitere Proteinbanden



**Abb.3.7: Aufreinigung von pGEX-4T-1 bzw. pGEX-4T-1/TLP1 1/2 über eine Glutathion-Sepharose-Säule.** Die Expression wurde mit 1mM IPTG induziert und bei 37°C über 3 Stunden durchgeführt. Die Proben (1) nicht induziert, (2) induziert; vor der Aufreinigung und (3) Eluat wurden auf einen 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt.

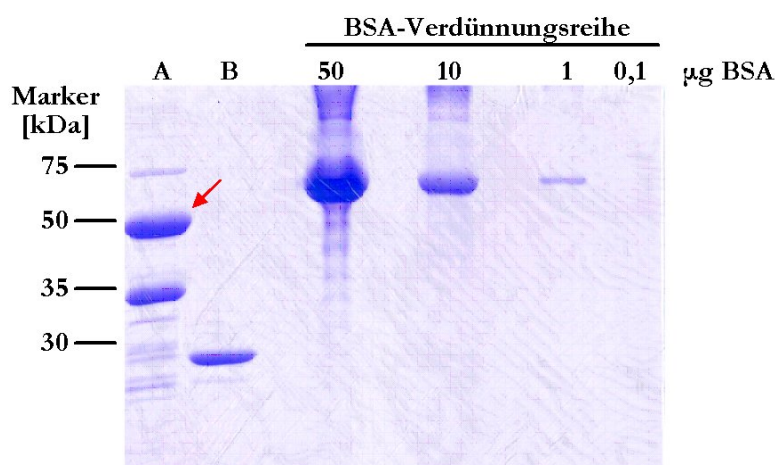


unterschiedlicher Molekulargrößen schwach zu erkennen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Kontaminationen, die durch die Säule nicht zurückgehalten werden konnten bzw. mit dem Fusionsprotein eluiert wurden.

Mit dem gewonnenen Eluat wurde für die Immunisierung und somit zur Gewinnung eines TLP1 Antiserums weiter verfahren.

#### 3.1.4.4 Konzentrationsbestimmung der gereinigten GST-TLP1-Fusion

Die Menge an gewonnenem Protein wurde mit Hilfe einer BSA-Verdünnungsreihe auf einem SDS-Gel ermittelt, um den Verlust an Probe möglichst gering zu halten. Dazu wurde BSA in verschiedenen Verdünnungen neben einem definierten Volumen (10 $\mu$ l) an gereinigtem Fusionsprotein aufgetragen (Abbildung 3.8) und dessen Konzentration abgeschätzt. Als Richtlinie wurde die 48kDa-Bande für diese Bestimmung herangezogen (Abbildung 3.8; durch Pfeil gekennzeichnet) und eine Konzentration von 15 $\mu$ g/10 $\mu$ l festgesetzt. Nach Berücksichtigung des Gesamtvolumens wurde so eine Endkonzentration von 1mg an gereinigtem Fusionsprotein bestimmt.

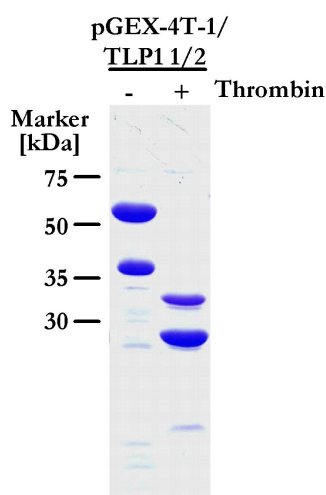


**Abb.3.8: Bestimmung der Konzentration an gereinigtem Fusionsprotein mittels BSA-Verdünnungsreihe.** Es wurden verschiedene BSA-Konzentrationen (50 $\mu$ g, 10 $\mu$ g, 1 $\mu$ g und 0,1 $\mu$ g) neben einem definierten Volumen an gereinigtem Fusionsprotein (A) und GST (B) auf ein 10%-iges Gel geladen und anschließend Coomassie gefärbt. Der Pfeil markiert die Proteinbande, die für die Konzentrationsbestimmung herangezogen wurde.

#### 3.1.4.5 Immunisierung und Test des gewonnenen TLP1-Anti-Serums

Für die Immunisierung wurden zwei Strategien verwendet. Zum einen wurde das Eluat, d.h. die GST-Fusion als Antigen verwendet. Zum anderen wurde versucht, GST durch Thrombinbehandlung aus der Fusion zu entfernen und somit nur das TLP1-Proteinfragment als

Antigen einzusetzen. Dazu wurde in einem Vorexperiment ein Aliquot des Eluats mit Thrombin gemischt und für zirka 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 1/3 Volumen an Glutathion-Sepharose-Säulenmaterial zugegeben und für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Sepharose sollte dabei das freigewordene GST binden. Die Proben wurden im Anschluss zentrifugiert und der Überstand auf einem SDS-Gel analysiert. Nach der Behandlung der aufgereinigten GST-Fusion mit Thrombin konnte eine deutliche Proteinbande bei zirka 26kDa und eine bei zirka 32kDa im Coomassie-Gel detektiert werden (Abbildung 3.9). Bei der 26kDa-Bande handelt es sich höchstwahrscheinlich um GST, das durch die Sepharose-Inkubation nicht vollständig entfernt werden konnte. Das kalkulierte Molekulargewicht des überexprimierten TLP1 1/2 Fragment beträgt zirka 20-22kDa. Allerdings weist das Fragment einen hohen Anteil an geladenen Aminosäuren auf, das wahrscheinlich dazu führt, dass das Fragment in einem SDS-Gel bei einem höheren Molekulargewicht erscheint. Deshalb entspricht die erhaltene zirka 32kDa-Proteinbande mit höchster Wahrscheinlichkeit dem TLP1-Fragment. Um dies zu bestätigen, wurde ein Western-Blot durchgeführt und mit dem Anti-GST Antikörper inkubiert (Daten nicht gezeigt). In diesem Immunoblot konnte die 26kDa-Proteinbande nachgewiesen werden, allerdings nicht das Protein mit dem höheren Molekulargewicht. Dies bedeutet, dass es sich bei dieser Proteinbande nicht um ein



**Abb.3.9: Thrombinbehandlung der aufgereinigten GST-TLP1 1/2-Fusion.** Ein Aliquot des gereinigten GST-TLP1 Fusionsproteins wurde mit Thrombin für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit Glutathion-Sepharose gemischt und eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Der durch eine Zentrifugation erhaltene Überstand wurde zusammen mit der aufgereinigten GST-Fusion auf einem 12%-igen SDS-Gel analysiert. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie. Abkürzungen: + (Inkubation des Fusionsproteins mit Thrombin), - (keine Zugabe von Thrombin).

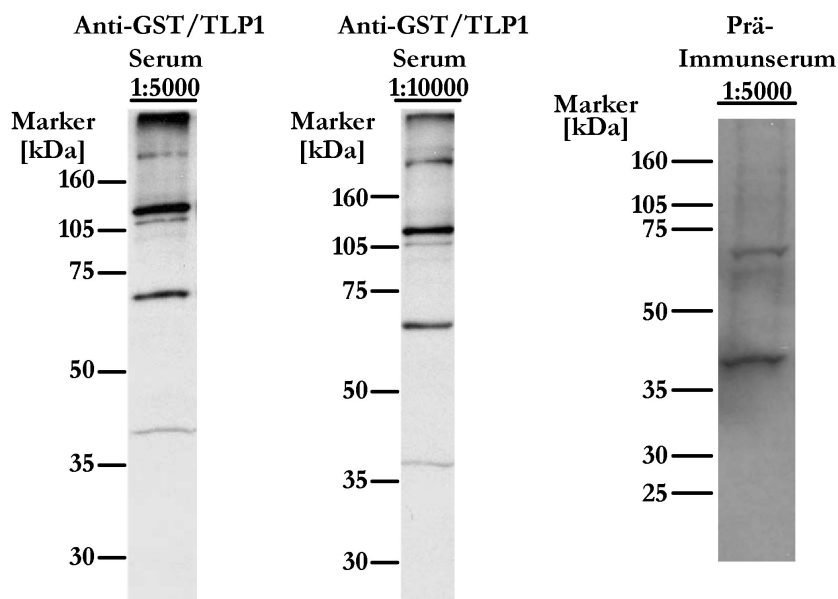
Abbauprodukt der GST-Fusion handeln kann. Außerdem wurde die Proteinbande aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten und sequenziert (Abteilung *Biomolecular Chemistry*, ZMBH, Heidelberg). Aus dieser Sequenzierung ging klar hervor, dass es sich bei der Proteinbande um das TLP1-Fragment handelt (Daten nicht gezeigt).

Da eine vollständige Entfernung von GST aus dem Ansatz durch die Verwendung der Glutathion-Sepharose nicht möglich war, wurde das Gemisch aus GST und TLP1-Fragment

nach dem Thrombinverdau auf einem SDS-Gel separiert. Für die folgende Immunisierung wurde das TLP1-Fragment aus dem SDS-Gel ausgeschnitten. Es wurden je 100µg Fusionsprotein und je 70µg TLP1-Fragment für die Immunisierung in Kaninchen eingesandt (Eurogentec, Belgien). Diese erfolgte nach einem Standard-Immunisierungs-Protokoll, wonach das Antigen viermal appliziert wurde. Die Zeitspanne zwischen der Ersten und Zweiten bzw. Zweiten und Dritten Injektion betrug 14 Tage und zwischen der Dritten und Vierten 28 Tage.

Nach Erhalt der Antiseren wurden diese zunächst auf ihre Spezifität getestet bzw. die optimale Antikörperkonzentration für Western-Blot-Analysen bestimmt. Dazu wurden Proteinextrakte von *P. berghei*-Schizonten mehrmals auf ein SDS-Gel geladen und die aufgetrennten Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Es wurden verschiedene Konzentrationen des Antiserums getestet. Mit dem Antiserum das mit der GST-TLP1 Fusion generiert wurde, konnte die optimale Antikörperverdünnung von 1:10000 ermittelt werden (Abbildung 3.10). Das errechnete Molekulargewicht von *P. berghei* TLP1 beträgt zirka 110kDa. Mit Hilfe des Antiserums konnte eine Proteinbande bei zirka 120kDa detektiert werden, die dem berechneten Molekulargewicht von TLP1 entspricht. Das Antiserum detektiert allerdings noch zwei weitere Proteinbanden bei zirka 70kDa bzw. 40kDa. Um eine Kreuzreaktion des Antiserums mit anderen Proteinen auszuschließen wurde das Prä-Immuneserum getestet. Dazu wurden erneut *P. berghei*-Proteinextrakte von Schizonten im Western-Blot analysiert. Das Prä-Immuneserum wurde in einer Verdünnung von 1:5000 mit der Membran inkubiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Prä-Immuneserum zwei deutliche Proteinbanden bei zirka 70kDa und 40kDa detektiert (Abbildung 3.10) und diese wahrscheinlich den Kreuzreaktionen des Antiserums entsprechen.

Für das zweite Antiserum, das mit Hilfe der aus dem Acrylamidgel ausgeschnittenen TLP1-Fragmente gewonnen wurde, konnte keine Spezifität nachgewiesen werden. Wahrscheinlich lag hier eine zu geringe Proteinkonzentration für die Immunisierung vor, so dass keine Antikörper erzeugt werden konnten.



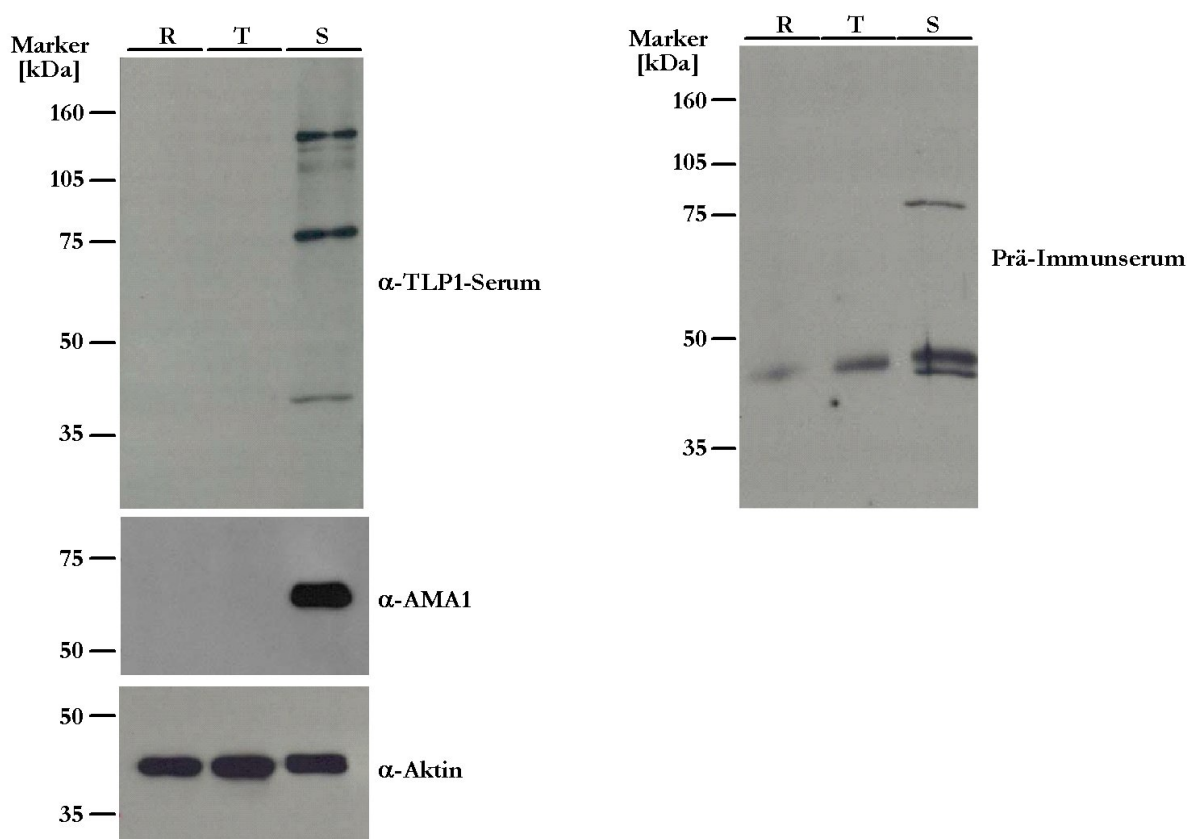
**Abb.3.10: Optimierung des GST-TLP1 Antiserums.** Proteinextrakte von *P. berghei*-Schizonten wurden in einer 1:10-Verdünnung mit 2x SDS-Puffer auf einem 10%-igen SDS-Gel separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Antiserum wurde in den Verdünnungen 1:5000 und 1:10000 getestet, das Prä-Immuneserum in einer Verdünnung von 1:5000. Der verwendete sekundäre, Peroxidasegekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper wurde 1:5000 eingesetzt.

### 3.1.5 Expressionsanalyse von TLP1

Um die unter 3.1.3 beschriebene Expression von TLP1 in Blutstadien genauer zu untersuchen, wurden Proteinextrakte von synchronisierten *P. berghei* erythrozytären Stadien (Ringe, Trophozoiten, Schizonten) auf die Expression von TLP1 mit dem gewonnenen Antiserum getestet (Abbildung 3.11). Als Kontrollen dienten zum einen AMA1 (*apical membrane antigen 1*), das in späten Schizonten exprimiert wird (Deans *et al.*, 1984; Peterson *et al.*, 1989) und zum anderen, die Expression von Aktin, die als Ladekontrolle herangezogen wurde, da Aktin in allen Blutstadien eine vergleichbare Expression aufweisen sollte. AMA1 wird in *P. falciparum* als Vorläuferprotein von 83kDa exprimiert und zu einer 66kDa/62kDa Form prozessiert (Narum und Thomas, 1994; Kocken *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2001), während in anderen *Plasmodium*-Arten AMA1 als 66kDa-Protein synthetisiert wird. Desweiteren wurde zum Nachweis der Spezifität des Antiserums das Prä-Immuneserum parallel getestet.

Mit Hilfe der Aktinkontrolle konnte bestätigt werden, dass bei allen drei Extrakten nahezu gleiche Mengen an Protein auf das Polyacrylamidgel geladen wurden und somit ein Vergleich der hier untersuchten Expressionsmuster möglich ist. In Schizonten-Stadien konnte mit dem TLP1 Antiserum eine Proteinbande bei zirka 130kDa detektiert werden, die mit dem kalkulierten Molekulargewicht von TLP1 (zirka 110kDa) übereinstimmt. Das hier gezeigte TLP1-Signal

scheint im Vergleich zu der in Abbildung 3.10 beschriebenen Proteinbande ein etwas höheres Molekulargewicht zu haben. Dies lässt sich damit erklären, dass in der hier gezeigten Analyse ein geringer prozentiges Gel zur besseren Auftrennung verwendet wurde. Das Expressionsmuster des *TRAP-like protein1* (TLP1) entspricht dabei dem des AMA1-Proteins, das ausschließlich in den späten erythrozytären Stadien detektiert werden konnte (Abbildung 3.11).

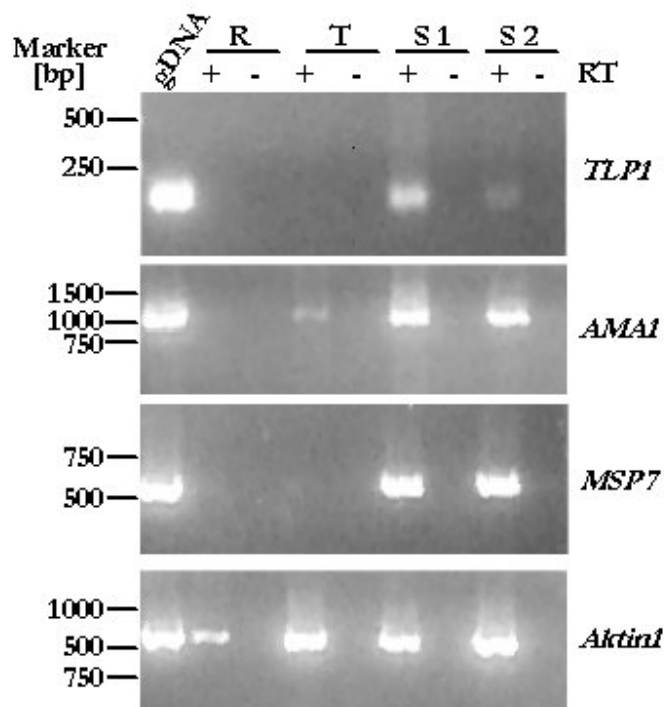


**Abb.3.11: Protein-Expression von TLP1 in unterschiedlichen asexuellen Blut-Stadien von *Plasmodium berghei*.** Proteinextrakte von Ring-, Trophozoiten- und Schizonten-Stadien wurden mehrfach auf ein 8%-iges SDS-Gel geladen und aufgetrennt. Die Extrakte von Ringen und Trophozoiten wurden dazu 1:5 bzw. die der Schizonten 1:10 mit 2x SDS-Ladepuffer verdünnt und jeweils 10 $\mu$ l geladen. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die getrennten Membranstücke mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert; TLP1 Antiserum (1:10000), Prä-Immuneserum (1:5000), Anti-AMA1 (1:30000), Anti-Aktin (1:2000). Abkürzungen: R (Proteinextrakt von Ring-Stadien), T (Proteinextrakt von Trophozoiten-Stadien), S (Proteinextrakt von Schizonten-Stadien), GST (Glutathion), TLP1 (*TRAP-like protein1*), AMA1 (*apical membrane antigen1*).

Das Prä-Immuneserum detektierte erneut in den Schizonten-Stadien Proteine mit einem Molekulargewicht von zirka 70kDa bzw. 40kDa (siehe auch Abbildung 3.10). Proteine mit diesem Molekulargewicht wurden auch mit dem Antiserum erkannt. Diese Kreuzreaktion kann somit auf

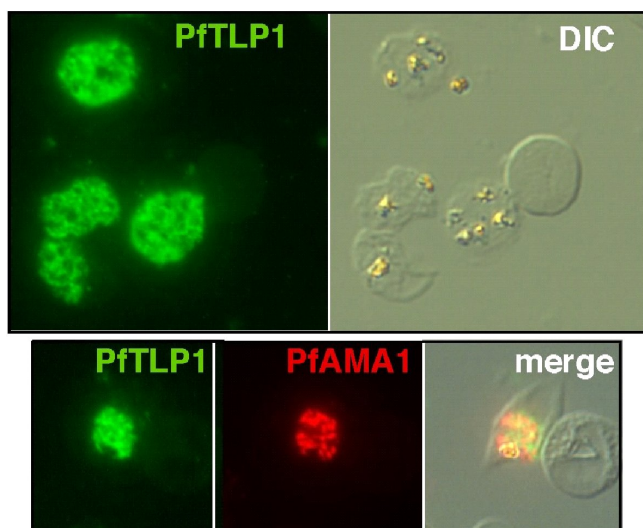
schon im Prä-Immunsereum vorkommende Antikörper zurückgeführt werden. Bei denen durch das Prä-Immunsereum bei zirka 45kDa zusätzlich auftretenden Proteinbanden bei Schizonten-, Ringen- und Trophozoiten-Extrakten, handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische Reaktionen des Prä-Immunsereums, da diese mit dem Antiserum nicht detektiert wurden. In *Plasmodium berghei*-Schizonten konnte somit die Expression von *TLP1* sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene gezeigt werden (Abbildung 3.5 und 3.11).

Im Folgenden wurde die Expression des *TRAP-like protein1* in dem humanen Erreger *Plasmodium falciparum* analysiert. Durch Synchronisation der *P. falciparum* Kulturen (HB3 bzw. 3D7) wurde PolyA<sup>+</sup>-RNA aus Ringen, Trophozoiten, späten Trophozoiten/frühen Schizonten und Schizonten isoliert und für die cDNA-Synthese bzw. die darauf folgende PCR-Analyse eingesetzt. Der Nachweis von *TLP1*-Transkripten erfolgte mit den gen-spezifischen Oligonukleotiden *Pf tlp1y2h for1/Pf tlp1y2h rev2*, durch die ein 129bp-Fragment amplifiziert wird. Desweiteren wurde als Kontrolle die mRNA-Expression von *Aktin1* (*Pf act1 for/Pf act1 rev*) und die der in Blutstadien beschriebenen Gene *AMA1* (*Pf ama1-66Cla/Pf ama1-D2Pst*; erhalten von H. Bujard, ZMBH, Heidelberg) und *MSP7* (*merozoite surface protein 7; Pf msp7 Nter22/Pf msp7 DPstC-ter*; erhalten von H. Bujard, ZMBH, Heidelberg) verwendet. Die Expression des *MSP7*-Gen ist in späten Schizonten, zeitgleich mit der Expression von *MSP-1*, beschrieben (Tewari *et al.*, 2005). In dieser RT-PCR-Analyse konnten *TLP1*-Transkripte nur in den untersuchten Schizonten-Stadien (S 1 und S 2) detektiert werden (Abbildung 3.12). Im Vergleich dazu konnte die Expression von *AMA1* bereits in Trophozoiten (T) schwach nachgewiesen werden. Für *MSP7* konnte ein ähnliches Expressionsmuster wie für *TLP1* gezeigt werden. So wird auch *MSP7* erst in Schizonten exprimiert. Allerdings zeigt *TLP1* in späten Schizonten-Stadien (S 2) eher eine Abnahme in der Expression. Diese Beobachtung ist gegensätzlich zu der in *Plasmodium berghei* deutlich gezeigten, Expression von *TLP1* (Abbildung 3.5) in späten Schizonten.



**Abb.3.12: Expressionsanalyse von *TLP1* in *P. falciparum* erythrozytären Stadien.** Gezeigt sind RT-PCRs mit PolyA<sup>+</sup>-RNA aus verschiedenen Stadien des erythrozytären Zyklus von *P. falciparum* als Matrize. Folgende Gene wurden getestet: *TLP1*, *AMA1*, *MSP7* und *Aktin*. Abkürzungen: gDNA (genomische DNA, HB3), R (cDNA aus Ringstadien, HB3), T (cDNA aus Trophozoiten, 3D7), S 1 (cDNA aus späten Trophozoiten/frühen Schizonten, HB3), S 2 (cDNA aus Schizonten, HB3), RT (Reverse Transkriptase), + (cDNA-Synthese mit RT), - (cDNA-Synthese ohne RT), *TLP1* (*TRAP-like protein 1*), *AMA1* (*apical membrane antigen 1*), *MSP7* (*merozoite surface protein 7*).

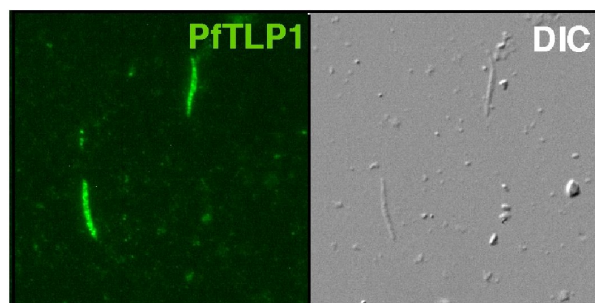
Um zu testen, ob die detektierte Abnahme auf Transkriptebene mit der Bildung des Proteins korreliert, wurden Immunofluoreszenz-Analysen mit synchronisierten *P. falciparum*-Kulturen (3D7) durchgeführt. Dabei konnten *TLP1* und *AMA1* mit spezifischen Antikörpern gegen die zytoplasmatische Domäne des jeweiligen Proteins nachgewiesen werden (Abbildung 3.13). Hierbei konnte gezeigt werden, dass *PfTLP1* in segmentierenden Schizonten partiell mit *PfAMA1* ko-lokalisiert.



**Abb.3.13: Proteinexpression von TLP1 in *P. falciparum*-Schizonten.** Gezeigt sind Immunofluoreszenz-Analysen von *P. falciparum*-Schizonten. Sowohl TLP1 als auch AMA1 wurden mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweilige zytoplasmatische Domäne detektiert (Thomas M. Daly und Lawrence W. Bergman, Philadelphia, USA).

In *P. berghei* konnten Transkripte des *TRAP-like protein1* auch in Speicheldrüsen-Sporozoiten detektiert werden (Abbildung 3.5). Durch Immunofluoreszenz-Analysen konnte das Protein in *P. falciparum*-Sporozoiten (Abbildung 3.14) nachgewiesen werden. Dieser Befund unterstützt die gezeigten Transkriptions-Daten in *P. berghei*.

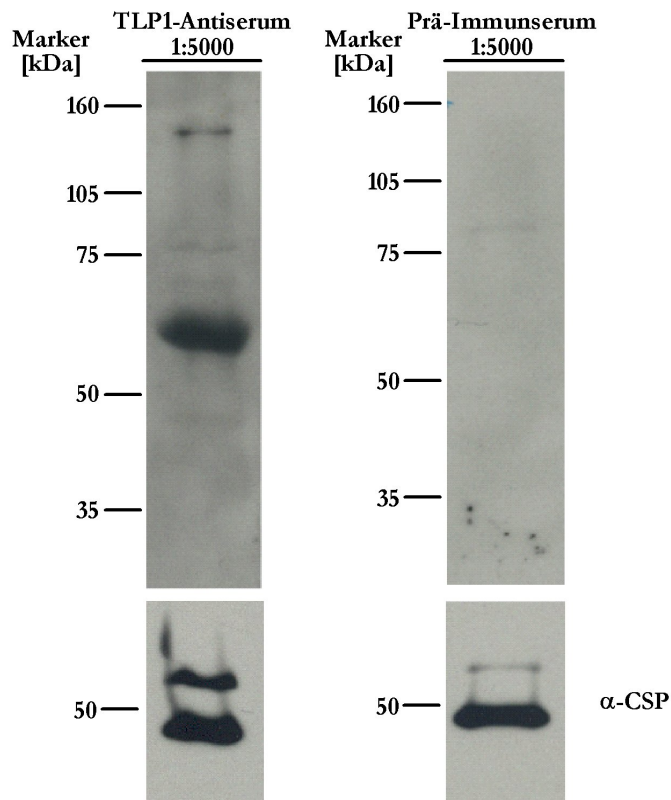
**Abb.3.14: TLP1 ist in *P. falciparum*-Sporozoiten exprimiert.** TLP1 wurde mit einem Antikörper gegen die zytoplasmatische Domäne des Proteins detektiert (Thomas M. Daly und Lawrence W. Bergman, Philadelphia, USA).



Zusätzlich wurde die Expression von TLP1 in *P. berghei*-Sporozoiten mit Hilfe von Western-Blot-Analysen untersucht (Abbildung 3.15). Da hier das Protein mit der für die Analyse in Blutstadien verwendeten Verdünnung des Antiserums (1:10000) nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde das Serum konzentrierter eingesetzt (1:5000). So konnte in Proteinextrakten von *P. berghei*-Sporozoiten ein Protein von zirka 130kDa nachgewiesen werden (Abbildung 3.15), das mit dem kalkulierten Molekulargewicht von TLP1 (zirka 110kDa) übereinstimmt. Auch für diese Analyse wurde das Prä-Immuneserum parallel getestet, durch das hier sehr schwach ein Protein von zirka 75kDa detektiert werden konnte. Ein Protein dieser Größe wurde auch durch das Antiserum erkannt, das somit auf eine Kreuzreaktion mit einem schon im Prä-Immuneserum



vorkommenden Antikörper zurückzuführen ist. Bei der durch das Antiserum sehr deutlich detektierte Proteinbande bei zirka 60kDa handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine

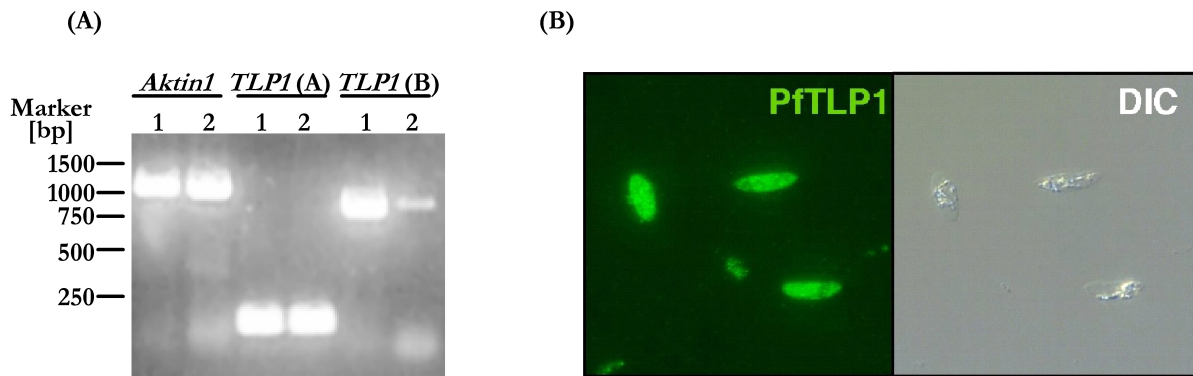


**Abb.3.15: TLP1 ist in *P. berghei*-Sporozoiten exprimiert.**

Proteinextrakte von jeweils  $10^5$  Speicheldrüsen-Sporozoiten wurden auf einem 8%-igen SDS-Gel separiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das TLP1-Antiserum, das Prä-Immunsereum und der Anti-CSP-Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Kontamination mit BSA. Das für die Präparation von Speicheldrüsen-Sporozoiten verwendete Medium enthält BSA. Wahrscheinlich konnte dieses bei der Herstellung der Proteinextrakte nicht vollständig entfernt werden. Das vergleichbare Mengen an Proteinextrakten für diese Analyse verwendet wurden, wurde durch die Detektion des CSP-Proteins (*circumsporozoite protein*) bestätigt.

In weiteren Expressionsanalysen konnte TLP1 außerdem in Gametozyten gefunden werden. *TLP1*-Transkripte konnten dabei in einer *P. falciparum* (3D7)-Gametozyten-cDNA-Bibliothek (Rawlings und Kaslow, 1992) mit zwei unterschiedlichen Primerkombinationen (*TLP1* (A) bzw. *TLP1* (B)) detektiert werden (Abbildung 3.16(A)). Das Vorkommen des Proteins in diesem Stadium des *Plasmodium*-Lebenszyklus wurde zusätzlich mit Hilfe von Immunofluoreszenz-Analysen bestätigt (Abbildung 3.16(B)).

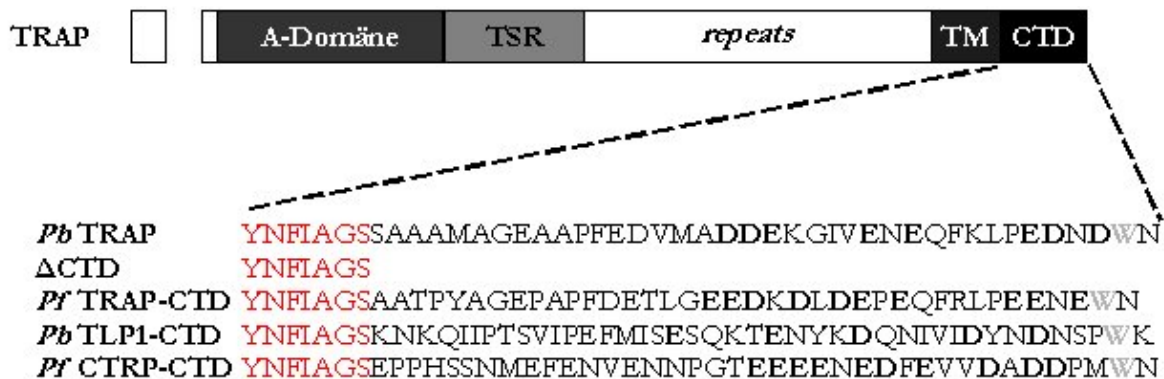


**Abb.3.16: Nachweis von TLP1 in *P. falciparum* Gametozyten.** (A) Die PCR wurde mit (1) gDNA von *P. falciparum* HB3 bzw. (2) einer *Pf* (3D7) Gametozyten-cDNA-Bibliothek durchgeführt. Für *Aktin1* wurden die gen-spezifischen Primer *Pf act1* for/*Pf act1* rev, für *TLP1 (A)* *Pf tlp1y2h* for1/*Pf tlp1y2h* rev2 [129bp-Fragment] und für *TLP1 (B)* *Pf tlp1 exp* for/*Pf tlp1y2h* rev3 [893bp-Fragment] verwendet. (B) TLP1 wurde mit einem Antikörper gegen die C-terminale zytoplasmatische Domäne in *Pf* Gametozyten detektiert (Thomas M. Daly und Lawrence W. Bergman, Philadelphia, USA).

### 3.2 Funktionelle Identifizierung von Invasinen der TRAP-Proteinfamilie

Auf Grundlage der Proteinstruktur kann TLP1 als weiteres Mitglied der TRAP-Familie definiert werden. Um dies funktionell bestätigen zu können, wurden Komplementationsstudien mit der zytoplasmatischen Domäne (CTD; *cytoplasmic tail domain*) durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die C-terminale Region von TLP1 die entsprechende Region des TRAP-Invasins in seiner Funktion komplementieren kann. Die zytoplasmatische Domäne von TRAP ist essentiell für die Gleitbewegung (*gliding motility*) sowie Invasion von *Plasmodium*-Sporozoitien (Kappe *et al.*, 1999). Die Autoren konnten zeigen, dass durch eine Verkürzung der C-terminalen Domäne des *P. berghei*-TRAP-Proteins die Parasiten nicht mehr fähig sind, ihre Zielzellen erfolgreich zu invadieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die entsprechende Region des *T. gondii*-Tachyzoiten-Invasins MIC2 (*micronemal protein 2*) diesen Defekt komplementieren kann. Basierend auf dieser Strategie wurden verschiedene TRAP-CTD *swap*-Mutanten in *Plasmodium berghei* hergestellt, die die zytoplasmatische Domäne von *P. falciparum* TRAP, *P. falciparum* CTRP bzw. *P. berghei* TLP1 (Abbildung 3.17) beinhalten. Als Negativ-Kontrolle diente dabei, in Anlehnung an die oben beschriebene Arbeit von Kappe *et al.*, eine TRAP-CTD-Mutante, bei der die zytoplasmatische Domäne größtenteils deletiert vorlag ( $\Delta$ CTD; Abbildung 3.17). Die in der Abbildung 3.17 beschriebene TRAP-CTD-*swap*-Mutante, die die zytoplasmatische Domäne des *P. falciparum*-TRAP-Orthologs enthält, wurde als Positiv-Kontrolle herangezogen. Als weitere Kontrolle wurde die CTD des beschriebenen TRAP-Familien-Invasins CTRP (*circumsporozoite- and*

*TRAP-related protein*) verwendet, das für die Infektion der Ookineten in das Mitteldarm-Epithelium im Moskito verantwortlich ist.



**Abb.3.17: Schematische Darstellung der Komplementations-Experimente.** Gezeigt ist die zytoplasmatische Domäne (CTD) von *P. berghei* TRAP; die verwendete Negativ-Kontrolle  $\Delta$ CTD, bei der die CTD zum größten Teil deletiert wurde; die Positiv-Kontrolle *Pf* TRAP-CTD, die die CTD des TRAP-Orthologs von *P. falciparum* besitzt; und den Austausch der TRAP-CTD mit der entsprechenden Region von *P. berghei* TLP1 (*Pb* TLP1-CTD) und *P. falciparum* CTRP (*Pf* CTRP-CTD). Die in der CTD vorkommenden negativ geladenen Aminosäuren sind in schwarz bzw. das konservierte Tryptophan in grau hervorgehoben. Abkürzungen: TSR (*thrombospondin type I repeat*), TM (Transmembrandomäne), CTD (*cytoplasmic tail domain*), TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*), TLP1 (*TRAP-like protein 1*), CTRP (*circumsporozoite- and TRAP-related protein*).

### 3.2.1 Herstellung von *P. berghei* TRAP-CTD-swap-Parasiten

#### 3.2.1.1 Konstruktion der Transfektionsvektoren für die TRAP-CTD Komplementationen

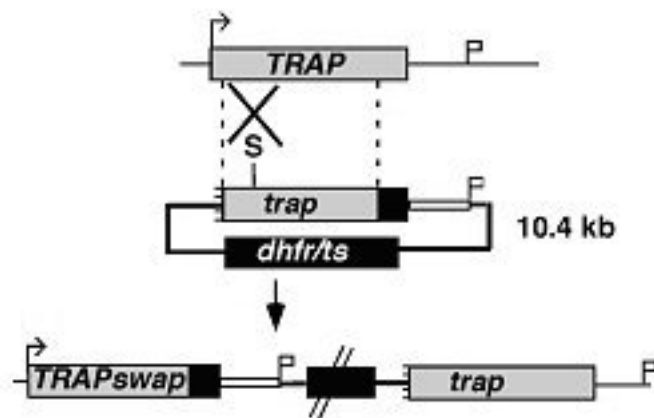
Zur Integration der verschiedenen TRAP-CTD Varianten in den *P. berghei* TRAP-Gen-Lokus wurde zunächst eine interne Sequenz des TRAP-Gens über PCR amplifiziert. Dabei handelte es sich um eine 5' und 3' verkürzte, 1635bp lange Sequenz des TRAP-Gens, so dass eine funktionsunfähige Form des Proteins entstand. Für diese PCR-Amplifikation diente genomische DNA von *P. berghei* NK65 als Matrize und es wurden die Oligonukleotide *Pb trapD5' for*/*Pb trapD5' rev* verwendet.

Dieses Fragment wurde mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und nach Aufreinigung in das Plasmid pSE02 ligiert, das mit den gleichen Restriktionsenzymen restringiert worden war. Durch die Verwendung des *Pb trapD5' rev*-Primer wurde eine zusätzliche *BamHI*-Schnittstelle vor ein Stoppkodon, für die nachfolgenden Klonierungen der weiteren zytoplasmatischen Domänen, eingeführt. Nach der Transformation in *E. coli*-Zellen wurden ampicillinresistente Kolonien selektiert und aus einem Stamm der Integrations-Vektor pKH01/ $\Delta$ CTD isoliert.

Desweiteren wurden die zytoplasmatischen Domänen folgender Proteine durch PCR amplifiziert, *P. falciparum* TRAP (*Pf trapfor*/*Pf traprev*), *P. berghei* TLP1 (*Pb tlp1for*/*Pb tlp1rev*) und *P. falciparum* CTRP (Thomas M. Daly und Lawrence W. Bergman, Philadelphia, USA). Als Matrize für diese Amplifikationen diente zum einen genomische DNA von *P. falciparum* und zum anderen genomische DNA von *P. berghei*. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit *Bam*HI und *Xba*I geschnitten und nach Aufreinigung in den oben beschriebenen Integrations-Vektor pKH01 kloniert. Daraus resultierten die Plasmide pKH02/*Pf*TRAP-CTD, pKH03/*Pb* TLP1-CTD und pNZ009/*Pf*CTRP-CTD. Zur Bestätigung der im Leseraster korrekten Fusion der zytoplasmatischen Domänen wurden die Plasmide sequenziert (Khseq-Sequenzier-Primer; gatc-Biotech, Konstanz).

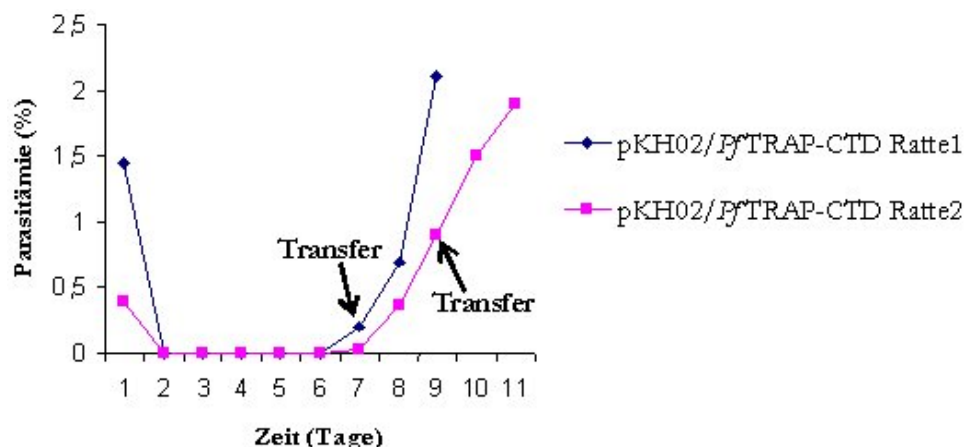
### 3.2.1.2 Gewinnung der TRAP-CTD-Parasiten mit Hilfe des *P. berghei* - Transfektionssystem

Durch das *P. berghei*-Transfektionssystem (van Dijk *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1997; Menard und Janse, 1997) ist es möglich, Gene gezielt auszuschalten bzw. zu modifizieren. Für das Ausschalten von Genen stehen zwei Strategien zur Verfügung: die Integrations- und die *Replacement*-Strategie. Für die Herstellung der TRAP-CTD-Parasiten wurde die Integrations-Strategie herangezogen, da nur diese Strategie für die spezifische Modifikation eines Gens benutzt werden kann. Mit Hilfe der in Abbildung 3.18 gewählten Integrations-Strategie wurde der endogene TRAP-Lokus so modifiziert, dass durch ein einfaches Rekombinationsereignis des Integrationskonstrukts der Gen-Lokus dupliziert wurde und somit die gewünschte Modifikation eingeführt werden konnte. Ein Nachteil der Integrationsstrategie ist, dass sich die homologen Regionen verdoppeln und diese somit rück-rekombinieren können. Dadurch kann das Transfektionskonstrukt herausgeschnitten werden, so dass die Wildtyp-Situation wieder vorliegt (*excision repair*). Allerdings kann durch lediglich ein Rekombinationsereignis die Integration effizienter generiert werden. In Abbildung 3.18 ist das verwendete Integrationskonstrukt für die jeweiligen Komplementationen schematisch dargestellt. Es enthält eine 5'-und 3'-verkürzte Version des TRAP-Gens, an die am 3'-Ende die jeweiligen C-terminalen Regionen der Proteine *Pf*TRAP, *Pb* TLP1 und *Pf*CTRP fusioniert ist. Die durch *Spe*I-linearisierten Konstrukte führen in *P. berghei* zu einer homologen Rekombination mit dem endogenen TRAP-Gen, wodurch die modifizierte TRAP *swap*-Version in das Genom des Parasiten eingeführt wird. Der durch die Integrations-Strategie duplizierte Gen-Lokus enthält nun eine funktionelle 5'-Kopie des TRAP-Gens (TRAP *swap*) und eine nicht-funktionelle, 5'-verkürzte Version am 3'-Ende, die aufgrund der fehlenden Promotorregion nicht transkribiert wird (Abbildung 3.18).



**Abb.3.18: Schematische Darstellung der Integrations-Strategie der TRAP-CTD-swaps in das Genom von *P. berghei*.** Oben ist der Wildtyp-Lokus des endogenen *TRAP*-Gens schematisch gezeigt. Dabei repräsentiert der Pfeil das Startkodon und die Fahne das Stoppkodon. Das Integrationskonstrukt ist schematisch für alle Komplementationskonstrukte darunter gezeigt. Es enthält eine 5'-verkürzte Version des *TRAP*-Gens mit den entsprechenden zytoplasmatischen Domänen im 3'-Bereich (schwarze Box), die 3'UTR von DHFR/TS und den Selektionsmarker *dhfr/ts*. Die mit S-gekennzeichnete Stelle signalisiert die *SpeI*-Schnittstelle. Unten ist der rekombinante Integrationslokus dargestellt. Durch ein einfaches Rekombinationsereignis wird das linearisierte Plasmid inseriert und dabei der Gen-Lokus dupliziert. Von den dabei entstandenen beiden Versionen des *TRAP*-Gens, die durch den Selektionsmarker getrennt werden, entspricht die 5'-terminale der funktionellen *TRAP-swap*-Kopie. Bei der 3'-terminalen Kopie handelt es sich um eine nicht transkribierte Version des *TRAP*-Gens, da der Promotorbereich und das Startkodon fehlt.

Für die Transfektion wurden 70µg DNA der jeweiligen, mit *SpeI* linearisierten, Transfektionskonstrukte eingesetzt. Diese wurden mittels Elektroporation in die Schizonten-Stadien des *P. berghei*-Stammes NK65 transfiziert und anschließend in Ratten injiziert. Die rekombinanten Parasiten wurden vom ersten Tag nach der Elektroporation durch die Behandlung der Tiere mit Pyrimethamin selektioniert. Die erste resistente Parasiten-Population wurde meist zwischen Tag 6 und Tag 8 sichtbar. Zur weiteren Selektion wurde diese Population in eine naive NMRI-Maus transferiert und die parentale Ratte weiter mit Pyrimethamin behandelt. Nach 3-4 Tagen konnten auch in den Transfer-Tieren Parasiten nachgewiesen werden, die auch einer weiteren Selektion durch Pyrimethamin unterzogen wurden. Abbildung 3.19 zeigt den Parasitämie-Verlauf einer Transfektion am Beispiel des Konstrukts pKH02/*Pf*TRAP-CTD.



**Abb.3.19: Parasitämie-Verlauf einer Transfektion am Beispiel des pKH02/PfTRAP-CTD-Konstrukts.** Gezeigt sind Parasitämie-Verläufe der beiden parentalen Ratten. Die Anfangsparasitämie wird 24 Stunden nach der Elektroporation bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt wird außerdem mit der Pyrimethamin-Verabreichung begonnen, wodurch die Parasitämie sinkt bzw. keine Parasiten mehr nachgewiesen werden können. Erste resistente Parasiten werden an Tag7 sichtbar. Der Transfer (Pfeil) der durch Pyrimethaminbehandlung selektierten Parasiten-Population in jeweils eine naive NMRI-Maus erfolgte bei Ratte1 bei einer Parasitämie von 0,2% an Tag7 und bei Ratte2 bei 0,9% an Tag9.

Durch einen Anstieg der Parasitämie unter Pyrimethaminbehandlung kann nicht direkt auf eine erfolgreiche Integration des Konstrukts zurück geschlossen werden. Es besteht die Möglichkeit, dass das Plasmid episomal vorliegt. Um sicher zu stellen, dass es sich bei der selektierten Population um Parasiten mit dem integrierten Konstrukt handelt, wurde die genomische DNA der Parasiten isoliert und durch PCR mit spezifischen Primerkombinationen analysiert. Diese Oligonukleotidkombinationen wurden so gewählt, dass nur im Falle einer Integration ein PCR-Fragment amplifiziert werden konnte, nicht aber bei Wildtyp bzw. einem episomal vorliegenden Integrationskonstrukt. Diese Integrations-positive Parasiten-Population wurde zur Selektion einer klonalen Population eingesetzt, da eine Kontamination durch resistente Wildtyp-Parasiten nicht ausgeschlossen werden kann. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, bei der statistisch gesehen nur ein Parasit pro Verdünnung injiziert wird. Hier ist zu beachten, dass die Ausgangsparasitämie zur Klonierung zwischen 0,1 und 1% liegen sollte (Thathy und Menard, 2002). Um eine solche Verdünnungsreihe herzustellen, wurde die Blutstadien-Population aus der Transfektion intraperitoneal (i.p.) in eine naive Maus injiziert. Bei einer Parasitämie zwischen 0,1 und 1% wurde das Blut durch Herzpunktion entnommen und für die Klonierung entsprechend verdünnt, so dass sich in 100 $\mu$ l statistisch nur ein Parasit befindet. Insgesamt 15 NMRI-Mäusen wurde somit ein Parasit intravenös (i.v.) injiziert. Nach 7 bis 10 Tagen konnten die ersten Parasiten in den Tieren detektiert werden. Zum Teil wurden mehr als 40% der Mäuse

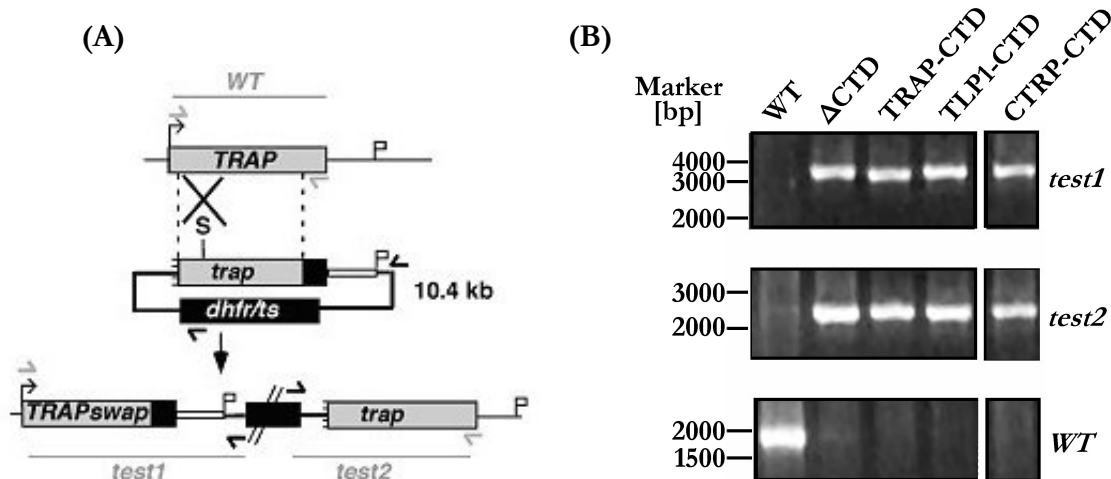
Blutstadien-positiv. Hier konnte davon ausgegangen werden, dass mit der Verdünnung mehr als nur ein Parasit pro Maus injiziert wurde. Klonierungen, die in Blutstadien-positiven Mäusen von über 50% resultierten, wurden ohne weitere Analyse wiederholt, da hier die Wahrscheinlichkeit einer Wildtyp-Kontamination sehr hoch war.

### 3.2.1.3 Genotypische Analyse der TRAP-CTD-*swap*-Parasiten

Um sicherzustellen, dass die gewonnenen Klone keine Kontamination durch Wildtyp-Parasiten aufweisen, wurde eine integrations-spezifische PCR mit der genomischen DNA dieser klonalen Population durchgeführt (Abbildung 3.20). Dazu wurden zum einen die Primerkombinationen (Abbildung 3.20 A) test1 (*Pb TRAP* for/T7 rev) und test2 (*T. gondii DHFR/TS* for/*Pb TRAP* rev) verwendet, durch die die Integration bestätigt wird. Bei beiden Kombinationen könnte sowohl bei einem episomal vorliegenden Transfektionsplasmid als auch bei Wildtyp kein PCR-Fragment amplifiziert werden. Als weitere Primerkombination diente WT (*Pb TRAP* for/*Pb TRAP* rev), mit der der Wildtyp-*Pb TRAP*-Lokus amplifiziert werden konnte. In Abbildung 3.20 B ist die integrations-spezifische PCR-Analyse von jeweils einer klonalen Population der TRAP-CTD-*swap*-Parasiten dargestellt. Diese wurden für alle nachfolgenden Analysen verwendet. Die insgesamt aus den jeweiligen Klonierungen hervorgegangenen klonalen Parasiten-Populationen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Duplikate sind genotypisch identisch, wurden aber in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

**Tabelle 3.1: Übersicht über die erhaltenen klonalen Parasiten-Populationen der TRAP-CTD *swap*-Parasiten aus der jeweiligen Klonierung.**

Parasit	$\Delta$ CTD	<i>Pf</i> TRAP-CTD	<i>Pb</i> TLP1-CTD	<i>Pf</i> CTRP-CTD
# Klone	2	1	2	1



**Abb.3.20: Integrations-spezifische PCR-Analyse der klonalen CTD-*swap*-Parasiten.** (A) Schematische Übersicht des rekombinanten Gen-Lokus nach erfolgter Integration der jeweiligen Transfektionskonstrukte. Durch die Pfeile werden die spezifischen Oligonukleotidkombinationen zum Nachweis der Integration bzw. der klonalen Population (*test1*, *test2* und *WT*) und die möglichen Hybridisierungsmöglichkeiten der Primer im Wildtyp-Lokus des endogenen *TRAP*-Gens, dem Transfektionsplasmid und dem rekombinierten Gen-Lokus dargestellt. Die Striche *test1*, *test2* und *WT* symbolisieren die mit diesen Primerkombinationen amplifizierten PCR-Fragmente. (B) Integrations-spezifische PCR. Gezeigt ist die PCR-Analyse, mit denen unter (A) beschriebenen Primerkombinationen, für jeweils eine klonale Population der TRAP-CTD-*swap*-Parasiten, die die erfolgreiche Integration am *TRAP*-Lokus aufweisen. Die Abwesenheit eines WT-spezifischen PCR-Fragments belegt den klonalen Ursprung der rekombinanten *swap*-Parasiten. Abkürzungen: WT (Wildtyp), S (*SpeI*-Schnittstelle).

### 3.2.2 Phänotypische Charakterisierung der *P. berghei* TRAP-CTD-*swap*-Parasiten

Durch die phänotypische Charakterisierung der TRAP-CTD-*swap*-Parasiten sollten Mitglieder der TRAP-Proteinfamilie funktionell identifiziert werden. Da *TRAP*, wie bereits beschrieben, eine essentielle Funktion bei der Invasion von Speicheldrüsen im Moskito-Vektor bzw. Hepatozyten im Säugetier-Wirt ausübt, wurde im Folgenden das Invasionsverhalten der TRAP-CTD-*swap*-Parasiten in die beiden Zielzellen analysiert. Desweiteren wurde die für Speicheldrüsen-Sporoziten typische Gleitbewegung (*gliding motility*) (Vanderberg, 1974), die ebenfalls durch TRAP vermittelt wird, untersucht. Dazu wurden die klonalen Parasiten-Populationen auf Moskitos übertragen. Wie erwartet konnte dabei kein Einfluss der TRAP-Modifikation auf das Wachstum der Blutstadien-Parasiten, der Bildung von Gametozyten und Exflagellation der Mikrogamonten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

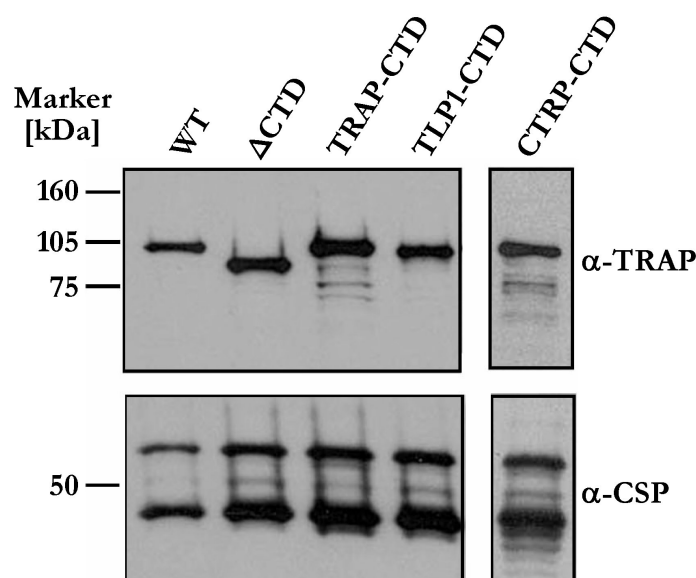


### 3.2.2.1 Der Austausch der zytoplasmatischen Domäne hat keinen Einfluss auf die Expression von TRAP

Zunächst wurde die Expression von TRAP bzw. der TRAP-Varianten durch Western-Blot-Analysen bestätigt (Abbildung 3.21). Dazu wurden Mitteldarm-Sporozoitien der jeweiligen Parasiten-Population aus den Moskitos isoliert und aus einer gleichen Anzahl von Sporozoitien Proteinextrakte hergestellt. Die Verwendung von Mitteldarm-Sporozoitien für diese Analyse ist wichtig, da die  $\Delta$ CTD-Parasiten nicht fähig sind, in die Speicheldrüsen einzudringen (Kappe *et al.*, 1999).

Die Expression von TRAP wurde mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des Proteins (*repeat region*) detektiert. Hierbei konnte für alle untersuchten TRAP-CTD-Varianten eine, im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten, ähnliche TRAP-Expression gezeigt werden. In der  $\Delta$ CTD-Mutante erscheint TRAP bei einem niedrigeren Molekulargewicht verglichen mit Wildtyp und den anderen CTD-Mutanten. Dies ist auf das Fehlen der zytoplasmatischen Domäne des TRAP-Proteins in dieser Mutante zurückzuführen.

Mit der als Ladekontrolle verwendeten Detektion des CSP-Proteins (*circumsporozoite protein*), das das Hauptoberflächen-Protein von Sporozoitien darstellt, konnte bestätigt werden, dass vergleichbare Mengen an Extrakten geladen wurden.

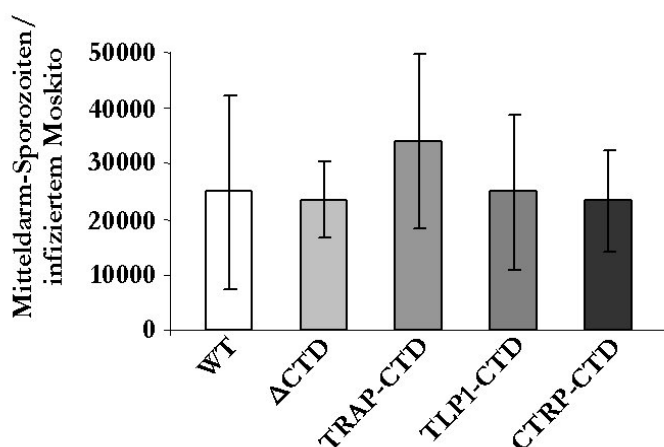


**Abb.3.21: Expression der TRAP-CTD-Varianten in Mitteldarm-Sporozoitien.** Es wurden Proteinextrakte von jeweils  $10^5$  Mitteldarm-Sporozoitien der entsprechenden TRAP-CTD-*swap*- und Wildtyp-Parasiten auf einem 10%-igen Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von TRAP und CSP erfolgte mit einem polyklonalen Antiserum gegen *Pb* TRAP (1:3000) bzw. einem monoklonalen Antikörper gegen CSP (1:5000).

### 3.2.2.2 Die TLP1-CTD-Mutante zeigt eine reduzierte Invasion in die Speicheldrüse im Moskito-Vektor

Um das Invasionsverhalten der TRAP-CTD-*snap*-Parasiten in den *An. stephensi* Moskitos zu untersuchen, wurden aus mehreren Fütterungsexperimenten die Anzahl an Sporozoiten sowohl aus dem Mitteldarm (Tag 14/15 nach der Infektion) als auch aus Speicheldrüse (Tag 17/18 nach der Infektion) ermittelt und mit Wildtyp-Parasiten verglichen. Bei der Entwicklung von Mitteldarm-Sporozoiten wurde im Falle der einzelnen Mutanten keine Beeinträchtigung erwartet, da das Eindringen der Ookineten in das Mitteldarm-Epithelium durch CTRP vermittelt wird und TRAP bei diesem Prozess keine Rolle spielt.

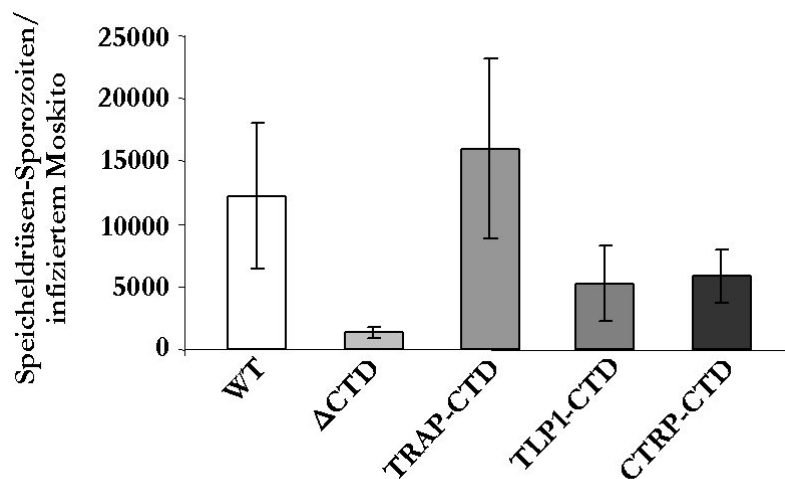
Mit den erhaltenen Zahlen für die Mitteldarm-Sporozoiten pro infiziertem Moskito konnte dies bestätigt werden (Abbildung 3.22). Die Werte sind vergleichbar mit den für Wildtyp-Parasiten ermittelten Zahlen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Invasion in das Mitteldarm-Epithelium sowie die Entwicklung zu Mitteldarm-Sporozoiten im Moskito in den TRAP-CTD-Mutanten nicht beeinträchtigt ist.



**Abb.3.22: Die TRAP-CTD-Mutanten invadieren das Mitteldarm-Epithelium vergleichbar zu Wildtyp-Parasiten.** Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SD) von Mitteldarm-Sporozoiten pro infiziertem Moskito. Die Daten stammen von mindestens 3 verschiedenen Fütterungsexperimenten. Abkürzungen: WT (Wildtyp).

Mit der Ermittlung der Anzahl an Speicheldrüsen-Sporozoiten konnte auf die Fähigkeit der einzelnen Mutanten, die Speicheldrüse zu invadieren, geschlossen werden. Wie erwartet, konnten die  $\Delta$ CTD-Parasiten nicht in die Speicheldrüsen eindringen (Kappe *et al.*, 1999). Bei den in Abbildung 3.23 erhaltenen Sporozoiten-Zahlen für die  $\Delta$ CTD-Mutante handelt es sich um Parasiten, die durch Anheftung an die Speicheldrüsen bei der Präparation mit aufgenommen

wurden. Die Komplementation durch die zytoplasmatischen Domäne von *Pf*TRAP konnte den  $\Delta$ CTD-Phänotyp wieder aufheben. Diese *Pf*TRAP-CTD-Parasiten konnten die Speicheldrüse vergleichbar zu Wildtyp-Parasiten invadieren. Sowohl die zytoplasmatische Domäne von CTRP als auch die entsprechende Region von TLP1 konnte den Phänotyp der  $\Delta$ CTD-Mutante partiell komplementieren. Beide zeigten eine ähnlich reduzierte Invasionsrate in die Speicheldrüsen des Moskito-Vektors verglichen mit Wildtyp- und *Pf*TRAP-CTD-Parasiten, die jedoch deutlich über der der Negativ-Kontrolle, den  $\Delta$ CTD-Parasiten, lag.



**Abb.3.23: Die TRAP-CTD-Mutanten zeigen eine unterschiedliche Invasionsrate in die Speicheldrüsen des Moskito-Vektors.** Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SD) von Speicheldrüsen-Sporozoiten pro infiziertem Moskito. Die Daten stammen von mindestens 3 verschiedenen Fütterungsexperimenten. Abkürzungen: WT (Wildtyp).

### 3.2.2.3 Die TLP1-CTD-*swap*-Mutante infiziert den Säugetier-Wirt *in vitro* und *in vivo*

Da TRAP für die Invasion in Hepatozyten essentiell ist, wurde in einem nächsten Schritt die Fähigkeit der TRAP-CTD-Mutanten, Leberzellen zu infizieren, untersucht. Nach dem erfolgreichen Eindringen des Parasiten in die Leberzellen vermehrt sich dieser sehr schnell über ein Schizontenstadium und bildet mehrere tausende Merozoiten, die den erythrozytären Zyklus initiieren können. Diese in der Leberzelle vorliegenden Stadien, die als exo-erythrozytäre-Formen (EEF) bezeichnet werden, können *in vitro* kultiviert und nach Antikörperfärbung analysiert werden (Hollingdale *et al.*, 1983). Durch das Auftreten dieser EEF-Formen bzw. deren Anzahl kann auf die Fähigkeit des Parasiten, in die Hepatozyten zu invadieren, geschlossen werden. Dazu wurden isolierte Speicheldrüsen-Sporozoiten ( $10^4$ ) der jeweiligen CTD-Mutante und Wildtyp-Parasiten zu kultivierten Hepatoma-Zellen (Huh7) gegeben und bis zur Entwicklung von

späten EEF-Formen (42 Stunden) inkubiert. Nach entsprechender Färbung wurden die gebildeten exo-erythrozytären-Formen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Parallel dazu wurde in Infektion der TRAP-CTD-Mutanten *in vivo* analysiert. Hierzu wurden die isolierten Speicheldrüsen-Sporozoit (10<sup>4</sup>) intravenös in die Schwanzvene von jungen SD-Ratten injiziert. Das Auftreten von Blutstadien-Parasiten wurde durch tägliche Blutausschläge ab dem dritten Tag nach der Infektion kontrolliert.

Im Falle einer Blutstadien-Infektion wurden die Parasiten genotypisch analysiert, indem die genomische DNA isoliert und auf das Vorhandensein des klonalen Gen-Lokus getestet wurde, da durch die verwendete Integrations-Strategie die Möglichkeit der Reversion zum WT-Genlokus durch *excision repair* besteht.

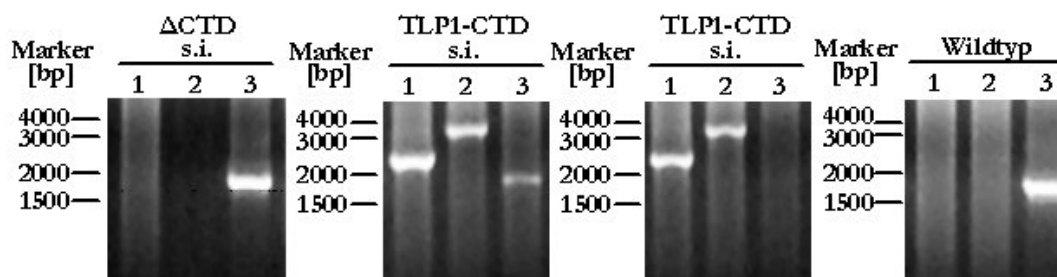
**Tabelle 3.2: Infektion von Hepatozyten durch die TRAP-CTD-Mutanten *in vitro* und *in vivo*.**

	<b>Anzahl an Leberstadien<sup>a</sup> (EEF-Formen)</b>	<b>Blutstadien-positive Tiere/ Anzahl an infizierten Tieren</b>	<b>Präpatenzzeit<sup>b</sup> (Tagen)</b>
<b>WT</b>	259 (± 48)	6/6	3,5
<b>ΔCTD</b>	0,9 (± 0,7)	0/6 <sup>c</sup>	-
<b><i>Pf</i>TRAP-CTD</b>	229 (± 75)	8/8 <sup>d</sup>	4,3
<b><i>Pb</i>TLP1-CTD</b>	34,5 (± 5)	5/5 <sup>e</sup>	4,5
<b><i>Pf</i> CTRP-CTD</b>	151 (± 92)	8/8 <sup>f</sup>	4,2

<sup>a</sup> Die Anzahl an Leberstadien (EEF-Formen) wurden 42 Stunden nach der Inkubation der jeweiligen Speicheldrüsen-Sporozoit (10<sup>4</sup>) mit kultivierten Hepatoma-Zellen (Huh7) bestimmt. Detektiert wurden die EEFs durch die Inkubation mit dem Anti-HSP70 Antikörper bzw. dem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten sekundären Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte (± SD) der gezählten EEF-Formen aus mindestens 3 Fütterungsexperimenten bzw. aus Mehrfachbestimmungen pro Experiment. <sup>b</sup> Die Präpatenzzeit entspricht der Zeit, nach der die ersten Blutstadien-Parasiten in Blutausschlägen nach der intravenösen Injektion von 10<sup>4</sup> Speicheldrüsen-Sporozoit detektiert werden konnten. <sup>c</sup> Bei einem Tier wurde eine Blutstadien-Infektion detektiert. Die genotypische Analyse zeigte eine vollständige Reversion zum TRAP-Wildtyp-Genlokus. <sup>d</sup> Bei einem der Blutstadien-positiven Tiere wurde eine gemischte Parasiten-Population, aus klonaler *Pf*TRAP-CTD-Population und Wildtyp, detektiert. <sup>e</sup> Bei drei der Blutstadien-positiven Tiere wurde eine gemischte Parasiten-Population, aus klonaler *Pb*TLP1-CTD-Population und Wildtyp, detektiert. <sup>f</sup> Bei zwei der Blutstadien-positiven Tiere wurde eine gemischte Parasiten-Population, aus klonaler *Pf*CTRP-CTD-Population und Wildtyp, detektiert.

Wie erwartet, konnte die TRAP-CTD-Mutante, bei der die zytoplasmatische Domäne von TRAP größtenteils deletiert wurde (ΔCTD), keine erythrozytäre Infektion in den Tieren induzieren (Tabelle 3.2). Dies korreliert mit den *in vitro* erhaltenen Daten, die zeigen, dass bei dieser Mutante

keine EEF-Formen detektiert werden konnten. Wie auch bei der Invasion der Speicheldrüsen im Mosquito-Vektor (Abbildung 3.23) konnte die zytoplasmatische Domäne von *Pf*TRAP diesen Defekt komplementieren. Die *Pf*TRAP-CTD-Sporozoiten zeigen eine mit Wildtyp-Parasiten vergleichbare Infektivität *in vitro* und *in vivo*. Dies trifft auch auf die *Pf*CTRP-CTD-Parasiten zu. Obwohl die Invasion der Speicheldrüsen durch *Pf*CTRP-CTD-Sporozoiten reduziert ist (Abbildung 3.23), konnte bei der Hepatozyten-Invasion eine mit *Pf*TRAP-CTD-Sporozoiten vergleichbare Infektivität detektiert werden. Die Komplementation der zytoplasmatischen Domäne von TRAP durch die entsprechende Region von TLP1 resultierte *in vitro* in einem intermediären Phänotyp zwischen  $\Delta$ CTD- und Wildtyp-Parasiten. Allerdings zeigten die *Pb* TLP1-CTD-Speicheldrüsen-Sporozoiten *in vivo* eine mit *Pf*TRAP-CTD Parasiten vergleichbare Infektivität. Beide Mutanten induzierten eine Blutstadien-Infektion mit ähnlicher Präpatenzzeit (Tabelle 3.2). Wie oben bereits erwähnt, wurden die Parasiten bei einer detektierten Blutstadien-Infektion genotypisch analysiert. Dazu wurde die genomische DNA der Parasiten isoliert und einer integrations-spezifischen PCR-Analyse, mit den in Abbildung 3.20(A) beschriebenen Oligonukleotidkombinationen, unterzogen. In Abbildung 3.24 sind drei der Analysen zusammen mit der Wildtyp-Kontrolle exemplarisch dargestellt. So konnte gezeigt werden, dass es sich bei



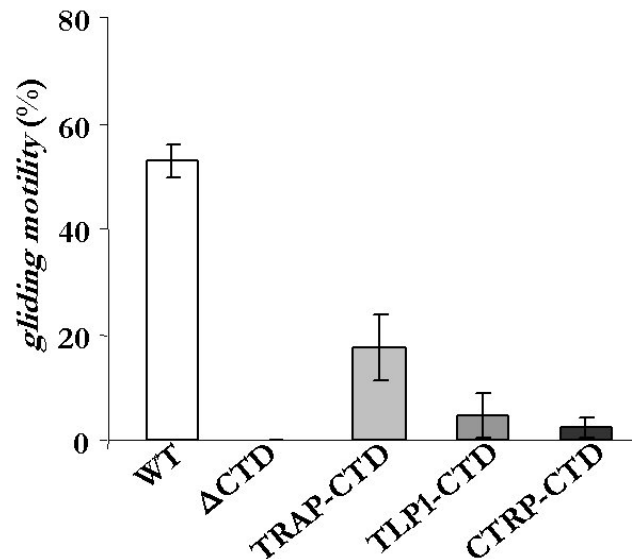
**Abb.3.24: Genotypische Analyse der durch Injektion der CTD-*smap*-Sporozoiten erhaltenen Blutstadien-Parasiten.** Dargestellt sind drei Beispiele der integrations-spezifischen PCR-Analyse mit der jeweiligen gewonnenen genomischen DNA aus Blutstadien-Parasiten und zusätzlich die Kontrolle mit genomischer DNA von Wildtyp-Parasiten. Die Nummern 1-3 repräsentieren die verschiedenen Primerkombinationen: 1 (*test2* in Abbildung 3.20(A); *T. gondii* DHFR/TS for/*Pb* TRAP rev); 2 (*test1* in Abbildung 3.20(A); *Pb* TRAP for/T7 rev); 3 (WT in Abbildung 3.20(A); *Pb* TRAP for/*Pb* TRAP rev). Abkürzungen: s.i. (Sporozoiten-induziert).

den detektierten Parasiten, die sich nach der Injektion der  $\Delta$ CTD-Sporozoiten entwickeln konnten (Tabelle 3.2), um eine durch Reversion entstandene Wildtyp-Population handelt. Bei der Analyse, der durch die Injektion der TLP1-CTD-Sporozoiten erhaltenen Blutstadien-Parasiten, konnte durch die integrations-spezifische PCR zum einen eine gemischte Parasiten-Population

festgestellt werden, d.h. bei einem Teil der Parasiten konnte Reversion zum Wildtyp-TRAP-Genlokus detektiert werden. Zum anderen konnte in einem weiteren unabhängigen Experiment die klonale Population nachgewiesen werden.

#### 3.2.2.4 Die TLP1-CTD-*swap*-Mutante zeigt einen reduzierten *gliding motility*-Phänotyp

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die zytoplasmatischen Domänen von TLP1 und CTRP die C-terminale Domäne von TRAP im Hinblick auf die Fortbewegung der Parasiten ersetzen können. Die essentielle Rolle der zytoplasmatischen Domäne von TRAP wurde durch verschiedene Deletionsmutanten gezeigt (Kappe *et al.*, 1999). Speicheldrüsen-Sporozoitien zeigen ein typisch zirkuläres Bewegungsmuster auf BSA-beschichteten Objektträgern (Vanderberg, 1974). Während der Fortbewegung hinterlassen sie Spuren von CS-Protein, die mit einem spezifischen Antikörper angefärbt werden können (Stewart und Vanderberg, 1988). Dadurch können zur *gliding motility* fähige Sporozoitien am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden und zu unbeweglichen Parasiten ins Verhältnis gesetzt werden. Das Ergebnis dieser Analyse für die TRAP-*swap*-Parasiten ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Als Positive Gleitbewegung wurden die typischen zirkulären aber auch die kurzen CSP-Spuren gezählt. Wildtyp-Parasiten zeigen *in vitro*, wie beschrieben (Vanderberg, 1974; Sultan *et al.*, 1997), eine typische *gliding motility* von zirka 55% (Abbildung 3.25). Wie erwartet, konnte bei den Parasiten, denen große Teile der zytoplasmatischen Domäne von TRAP fehlen, keine Gleitbewegung nachgewiesen werden. Unerwarteterweise konnte jedoch dieser Defekt nur teilweise durch die C-terminale Region von *Pf*TRAP komplementiert werden. Die TRAP-CTD-*swap*-Parasiten zeigten einen reduzierten *gliding motility*-Phänotyp (zirka 20%) im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten. Die Fähigkeit zur Fortbewegung sowohl der TLP1- als auch die CTRP-CTD-*swap*-Parasiten lag bei nur  $\leq 10\%$ . Somit konnte die zytoplasmatische Domäne von *Pf*TRAP die Funktion der *Pb* TRAP-CTD hinsichtlich der *gliding motility* nur partiell bzw. die entsprechenden Domänen von TLP1 und dem Ookineten-Invasin CTRP nur geringfügig komplementieren.



**Abb.3.25: Die TRAP-CTD-Mutanten zeigen einen reduzierten *gliding motility*-Phänotyp.** Die Sporozoiten wurden aus den Speicheldrüsen der Mücken isoliert und für 20-30 Minuten auf BSA-beschichteten 8 *well*-Objektträgern ( $10^4$  Sporozoiten/*well*) bei 37°C inkubiert. Mit einem Antikörper gegen *Pb* CSP wurden die, während der Gleitbewegung hinterlassenen, CSP-Spuren angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Für ein positives *gliding* wurden die typischen zirkulären und auch die kurzen CSP-Spuren gezählt und den unbeweglichen Sporozoiten gegenüber gestellt. Die Daten stammen von mindestens 2 verschiedenen Fütterungsexperimenten bzw. aus Mehrfachbestimmungen pro Experiment. Abkürzungen: CSP (*circumsporozoite protein*); WT (Wildtyp).

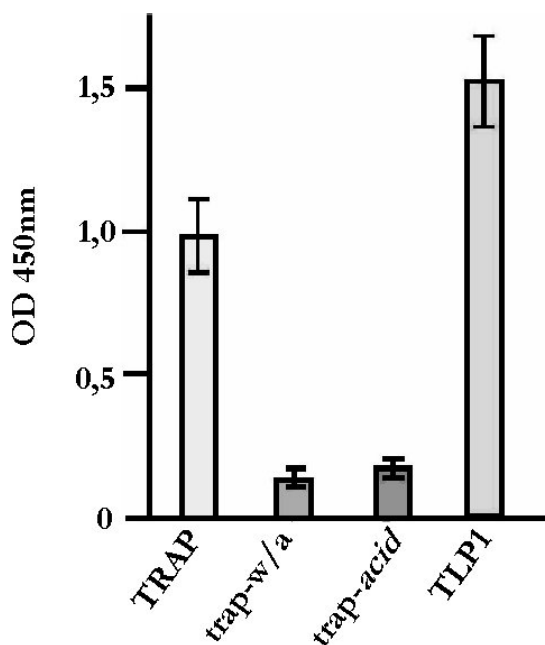
### 3.2.3 Die zytoplasmatische Domäne von TLP1 bindet Aldolase *in vitro*

Mit Hilfe von GST-Fusionen der C-terminalen Domäne sowohl von *P. falciparum* TRAP als auch von *T. gondii* MIC2 konnte das Aktin-bindende Protein Aldolase als Interaktionspartner identifiziert werden (Jewett und Sibley, 2003). Desweiteren konnten die Autoren zeigen, dass das konservierte Tryptophan in der zytoplasmatischen Domäne (CTD) beider Proteine essentiell für die beschriebene Interaktion ist. In einer weiteren Arbeit wurde deutlich, dass zusätzlich zu dem Tryptophanrest, zwei nicht-benachbarte Abfolgen von negativ geladenen Aminosäuren in der C-terminalen Domäne von TRAP eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit Aldolase aufweisen (Buscaglia *et al.*, 2003).

Die identifizierte Bindung von Aldolase an die zytoplasmatische Domäne von TRAP und TRAP-Homologen wurde im Weiteren für TLP1 untersucht. Hierbei sollte bestätigt werden, dass die C-terminale Region von TLP1 die Funktion der entsprechenden Domäne von TRAP ersetzen kann. Für diese *in vitro*-Bindungsanalysen (Buscaglia *et al.*, 2003) wurden die mit einem His-tag versehene zytoplasmatischen Domänen von TRAP und TLP1 an eine Mikrotiter-Platte gebunden und mit

Biotin-gekoppelter GST-Aldolase inkubiert. Die erfolgte Bindung von Aldolase wurde mit Hilfe einer Avidin-Substrat-Reaktion quantifiziert. Dabei wurde die oben beschriebene Bindung von Aldolase an die C-terminale Domäne von TRAP als Kontrolle/Referenz verwendet.

Mit Hilfe dieser Bindungsstudien konnte gezeigt werden, das auch die zytoplasmatische Domäne von TLP1 effizient an die Aldolase bindet (Abbildung 3.26). Desweiteren konnte bestätigt werden, das für die Bindung der C-terminalen Domäne von TRAP an das Aldolase-Protein sowohl das konservierte Tryptophan, als auch die negativ geladenen Aminosäure-Reste in der CTD von TRAP von Bedeutung sind. Mutationen in einer der beiden Motive (*trap-w/a* bzw. *trap-acid*) führten zu einer stark reduzierten Interaktion zwischen Aldolase und TRAP-CTD (Abbildung 3.26).



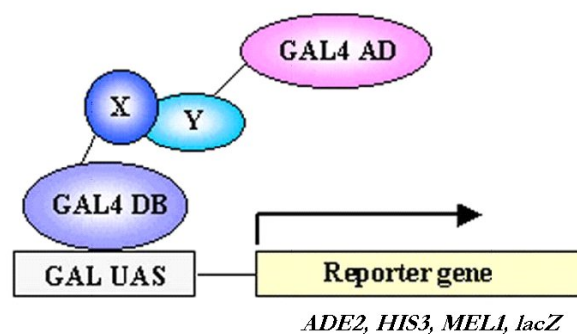
**Abb.3.26: Aldolase bindet an die zytoplasmatische Domäne von TLP1.** Die mit einem His-tag versehenen C-terminalen Domänen von *P. berghei* TRAP, zwei TRAP-Mutanten und *P. falciparum* TLP1 wurden an eine Mikrotiter-Platte gebunden und mit Biotin-gekoppelter GST-Py Aldolase inkubiert. Gebundene Aldolase wurde durch eine Avidin-Substrat-Reaktion quantifiziert (Thomas M. Daly und Lawrence W. Bergman, Philadelphia, USA). Abkürzungen: *trap-w/a* (Mutation des Tryptophan gegen Alanin); *trap-acid* (Mutation der negativ geladenen Reste).

### 3.2.4 *In vivo*-Analyse der Interaktion zwischen TLP1-CTD und Aldolase mit dem *yeast-two-hybrid*-System

Mit der unter 3.2.3 beschriebenen Bindungsanalyse konnte eine Interaktion zwischen Aldolase und der zytoplasmatischen Region von TLP1 *in vitro* identifiziert werden. Um diese Beobachtung *in vivo* zu analysieren, wurde das *yeast-two-hybrid*-System verwendet. Hier wurde zunächst in einer direkten Interaktionsanalyse die Bindung von TLP1-CTD an Aldolase untersucht. Prinzipiell werden dazu die zu untersuchenden Proteine bzw. Proteindomänen als Fusion mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne bzw. mit der Gal4-Aktivierungsdomäne exprimiert (Abbildung 3.27).



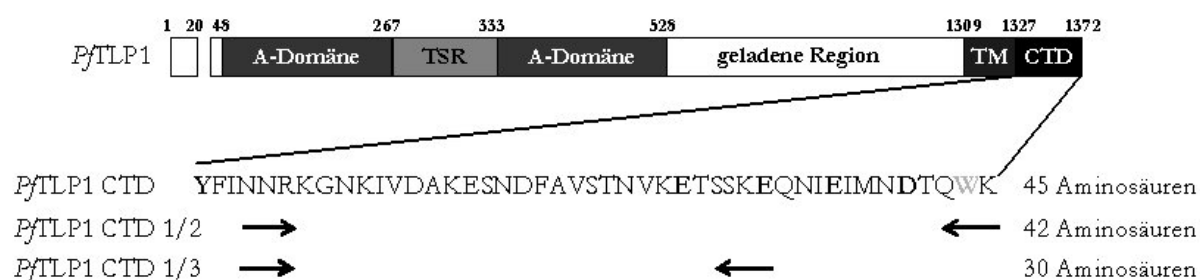
Nach Transfektion der Konstrukte in einen Hefestamm, der mit den jeweiligen Reportergenen ausgestattet ist, können mögliche Interaktoren identifiziert werden. Dies beruht darauf, dass ausschließlich bei einer vorliegenden Interaktion zweier Proteine die Transkription der Reportergene angeschaltet wird und dies dem transformierten Hefestamm ein Wachstum auf entsprechenden Selektivplatten ermöglicht.



**Abb.3.27: Schematische Darstellung des yeast-two-hybrid-Systems.** Ein Protein X wird als Fusion an die Gal4-DNA-Bindedomäne (DB) bzw. ein Protein Y als Fusion an die Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) exprimiert. Bei dem Protein Y kann es sich auch um ein aus einer cDNA-Bibliothek stammendes Protein handeln. Durch Interaktion der Proteine X und Y wird die Transkription der Reportergene (*ADE2*, *HIS3*, *MEL1*, *lacZ*) initiiert. Abkürzungen: UAS (*upstream activating sequence*), BD (DNA-Bindedomäne), AD (Aktivierungsdomäne).

Für die Analyse der direkten Interaktion wurden zwei unterschiedliche Varianten der C-terminalen Region von *P. falciparum* TLP1 (Abbildung 3.28) als Fusion mit der Gal4-DNA-Bindedomäne kloniert (pGBKT7-Vektor, Clontech). Dabei wurde bei beiden Varianten das nach der Transmembrandomäne vorkommende *sorting motif* nicht mit einbezogen. Dieser Sequenzbereich ist für diese Analyse nicht essentiell, ist jedoch für den Transport von TRAP in die sekretorischen Vesikel und zudem an die Zelloberfläche verantwortlich (Bhanot *et al.*, 2003). Die verwendeten C-terminalen Sequenzen unterscheiden sich in ihrer Länge; *Pf*TLP1 CTD 1/2 beinhaltet die vollständige zytoplasmatische Domäne, wohingegen *Pf*TLP1 CTD 1/3 die letzten 12 Aminosäuren fehlen. In diesem fehlenden Sequenzabschnitt liegen bei TRAP die an der Aldolasebindung beteiligten Aminosäure-Reste. Die beiden durch PCR amplifizierten CTD-Fragmente von *P. falciparum* TLP1 wurden jeweils mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten pGBKT7-Vektor ligiert. Nach erfolgter Transformation in *E. coli* konnten für beide Konstrukte Kanamycin-resistente Kolonien selektioniert und die Plasmide pGBKT7/*Pf tlp1* 1/2 und pGBKT7/*Pf tlp1* 1/3 isoliert werden.

Desweiteren wurde die vollständige Sequenz der *P. berghei* Aldolase als Fusion zu der Gal4-Aktivierungsdomäne kloniert (pGADT7-Rec-Vektor, Clontech). Für die PCR-Amplifikation diente genomische DNA von *P. berghei* NK65 als Matrize und es wurden die Oligonukleotide *Pb aldo for*/*Pb aldo rev* verwendet. Das resultierende zirka 1050bp-Fragment wurde mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen restringierten pGADT7-Rec-Vektor ligiert. Nach Transformation in *E. coli* konnten Ampicillin-resistente Kolonien selektiert werden und aus einem Stamm das Plasmid pGADT7-Rec/*Pb aldolase* isoliert werden.



**Abb.3.28: Schematische Darstellung der für die direkten Interaktionsanalysen verwendeten Bereiche der zytosolmatischen Domäne von TLP1.** Oben ist die Proteinstruktur von *PfTLP1* gezeigt. Hervorgehoben ist die Aminosäuresequenz der zytosolmatischen Domäne (CTD) mit dem konservierten Tryptophan (grau), den negativen Resten (schwarz) und dem Tyrosin (schwarz). Die Pfeile markieren die Startstellen der verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung der Fusionen mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne. Abkürzungen: TLP1 (*TRAP-like protein1*); TSR (*thrombospondin tpyeI repeat*), TM (Transmembrandomäne), CTD (*cytoplasmic tail domain*).

Als (System-) Kontrolle für die folgenden direkten Interaktionsanalysen wurde die in *Plasmodium* beschriebene, mit Hilfe des *yeast-two-hybrid*-Systems identifizierte, Interaktion zwischen der MyosinA-*tail* Domäne und MTIP (*myosinA tail domain interacting protein*) benutzt (Bergman *et al.*, 2003). Dazu wurde die *tail*-Domäne von *P. berghei* MyosinA aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden *Pb myoA for*/*Pb myoA rev* durch PCR amplifiziert (281bp) und mit der oben beschriebenen Klonierungsstrategie mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert. Für die Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne wurde die gesamte Sequenz von *P. berghei* MTIP (615bp) in den pGADT7-Rec-Vektor kloniert.

Alle im Weiteren aufgeführten Konstrukte für die Analyse direkter Interaktionen wurden, in Abhängigkeit von der Orientierung, nach der gleichen Klonierungsstrategie entweder in den pGBKT7-Vektor oder in den pGADT7-Rec-Vektor kloniert. Außerdem wurden alle verwendeten Plasmide sequenziert (T7-Sequenzier-Primer; gatc-Biotech, Konstanz), um eine im Leseraster korrekte Fusion zu bestätigen.

Bevor die hergestellten Fusionsproteine auf eine mögliche Interaktion getestet werden konnten, musste sichergestellt werden, dass die an die Gal4-DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) fusionierten Konstrukte alleine nicht transkriptionell aktiv sind (autoaktivierend), d.h. die Transkription der Reportergene ohne Aktivierungsdomäne initiieren können. Um dies zu testen, wurden die DNA-BD-Fusions-Plasmide in den Hefestamm AH109 (Clontech) transfiziert. Zur Kontrolle der Plasmid-Aufnahme wurden die Transfektanden auf Selektivplatten (SD) ohne Tryptophan (SD-Trp) ausplattiert. Um hingegen die mögliche Autoaktivierung der Konstrukte zu testen, wurden die Transfektanden zusätzlich auf Selektivplatten ohne Tryptophan und ohne Histidin (SD-Trp-His) ausplattiert. Bei *HIS* handelt es sich um eines der Reportergene (Abbildung 3.27), d.h. auf dieser Selektivplatte können nur Hefezellen wachsen, die mit einem DNA-BD-Konstrukt, welches die Eigenschaft zur Autoaktivierung besitzt, transfiziert wurden. Nach der Transfektion in den AH109-Hefestamm können die Transfektanden eine etwas erhöhte *HIS3*-Expression zeigen, die auf eine intrinsische Transkriptions-Aktivierungseigenschaft des mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne fusionierten Proteins zurückgeführt werden kann. Durch die Verwendung eines kompetitiven Inhibitors (*3-amino-1,2,3-triazole*) des *HIS3*-Proteins von Hefe kann die schwache Basal-Expression des Proteins und zugleich das Hintergrund-Wachstum auf SD-His-Platten unterdrückt werden. Der AH109-Stamm enthält vier Reportergene (*ADE2*, *HIS3*, *MEL1*, *lacZ*) die alle unter der Kontrolle von drei verschiedenen GAL4 stromaufwärts gelegenen Aktivierungssequenzen (*UAS*, *upstream activating sequences*) und der TATA-Box liegen. Um die Häufigkeit von Falsch-positiven zu reduzieren sollte auf *ADE2* und *HIS3* selektioniert werden.

Der Test auf Autoaktivierung der Konstrukte pGBKT7/*Pf tlp1* 1/2, pGBKT7/*Pf tlp1* 1/3 und pGBKT7/*Pb myosinA* ergab, dass alle ein schwaches Hintergrund-Wachstum auf SD-Trp-His-Platten aufwiesen. Allerdings war dieses vergleichbar mit Transfektanden, die nur mit dem pGBKT7-Vektor transfiziert wurden. Auf den parallel verwendeten SD-Trp-Platten, durch die die Aufnahme der Plasmide kontrolliert wurde, konnten zwei Tage nach der Transfektion Kolonien detektiert werden. Nach längerer Inkubation beider Selektivplatten war ein deutlicher Unterschied im Durchmesser der Kolonien sichtbar. Die auf SD-Trp wachsenden Kolonien wurden größer wohingegen die auf den SD-Trp-His-Platten wachsenden Kolonien keine Veränderung im Durchmesser zeigten. Das hier ermittelte schwache Hintergrund-Wachstum der Transfektanden auf SD-Trp-His-Platten wurde im Folgenden vernachlässigt, da zum einen für die Selektion auf eine mögliche Interaktion ein weiteres Reportergen herangezogen wurde und zum anderen ein deutlicher Unterschied im Wachstum der Transfektanden auf SD-Trp-His-Platten festgestellt wurde.

Für die Analyse der direkten Interaktion wurden die Hefestämme T7/*Pf tlp1 tail1/2*, T7/*Pf tlp1 tail1/3* und T7/*Pb myoA* (siehe unter 2.1.6.2) jeweils in SD-Trp-Medium angeimpft und am nächsten Tag für die Transfektion der zu untersuchenden Fusionen mit der Gal4-Aktivierungsdomäne eingesetzt. Zusätzlich wurde jeweils auch der „leere“ Vektor pGADT7-Rec in diese Hefestämme transfiziert. Dieser Ansatz fungierte dabei als Negativ-Kontrolle der zu analysierenden Interaktion. Als Positiv-Kontrolle für eine Proteininteraktion, die zugleich als Systemkontrolle herangezogen werden konnte, diente die beschriebene Interaktion zwischen MyosinA und MTIP. Die Transfektanden wurden zur Kontrolle auf SD-Trp-Leu-Selektivplatten ausgestrichen. Hierbei wurde auf das Vorhandensein beider Plasmide, d.h. auf die jeweiligen Fusionskonstrukte mit der Gal4-DNA-Binde- und Gal4-Aktivierungsdomäne, selektioniert. Zusätzlich konnte damit auf die Effizienz der Transfektion geschlossen werden. Die Selektion möglicher Proteininteraktionen wurde auf SD-Trp-Leu-His-Ade-Platten durchgeführt. Wie erwartet, konnten alle Transfektanden auf den verwendeten Kontrollplatten (SD-Trp-Leu) wachsen. Mit den auf SD-Trp-Leu-His-Ade-Platten gewachsenen Kolonien konnte die von Bergmann *et al.* beschriebene MyosinA/MTIP Interaktion mit dem hier angewandten System bestätigt werden (Bergman *et al.*, 2003). Allerdings konnte die *in vitro* detektierte Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne von TLP1 und Aldolase (Abbildung 3.26) hier nicht detektiert werden (Tabelle 3.3). Auf den SD-Trp-Leu-His-Ade-Platten konnten auch nach längerer Inkubation der Platten bei 30°C keine Kolonien wachsen. Dies bedeutet, dass die zum Wachstum auf diesem Plattentyp erforderliche Transkription der Reportergene *HIS* und *ADE* aufgrund einer fehlenden Interaktion der Proteine nicht initiiert werden konnte. Bei dem verwendeten Konstrukt pGBKT7/*Pf tlp1 1/3* fehlen die letzten 12 Aminosäure-Reste in der zytoplasmatischen Domäne von TLP1, d.h. sowohl das Tryptophan als auch mehrere der negativ geladenen Reste wurden deletiert. Wie bereits erwähnt konnte für die C-terminale Domäne von TRAP gezeigt werden, dass diese Reste bei der Interaktion mit Aldolase eine wichtige Rolle spielen. Aufgrund dessen wurde mit der verkürzten zytoplasmatischen Domäne von TLP1 eine negative Aldolasebindung erwartet. Diese Aussage kann nicht getroffen werden, da auch mit dem vollständigen C-terminalen Bereich von TLP1 die Interaktion mit Aldolase nicht bestätigt werden konnte. Ein methodischer Fehler konnte mit der MyosinA/MTIP-Kontrolle ausgeschlossen werden.

Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden weitere Interaktionen getestet. Zunächst wurde die durch GST-Fusionen (Jewett und Sibley, 2003) entdeckte Interaktion zwischen Aldolase und der zytoplasmatischen Domäne von TRAP mit dem hier beschriebenen System in

**Tabelle 3.3: Ergebnis der direkten Interaktionsanalyse zwischen der zytoplasmatischen Domäne von TLP1 und Aldolase.**

Interaktion	pGADT7-Rec/ <i>Pb aldolase</i>	pGADT7-Rec/ <i>Pb mtip</i>	pGADT7-Rec	
pGBKT7/ <i>Pb myosinA</i>	nicht analysiert	positiv	negativ	SD-Trp-Leu- His-Ade Platten
pGBKT7/ <i>Pf tlp1 1/2</i>	negativ	nicht analysiert	negativ	
pGBKT7/ <i>Pf tlp1 1/3</i>	negativ	nicht analysiert	negativ	

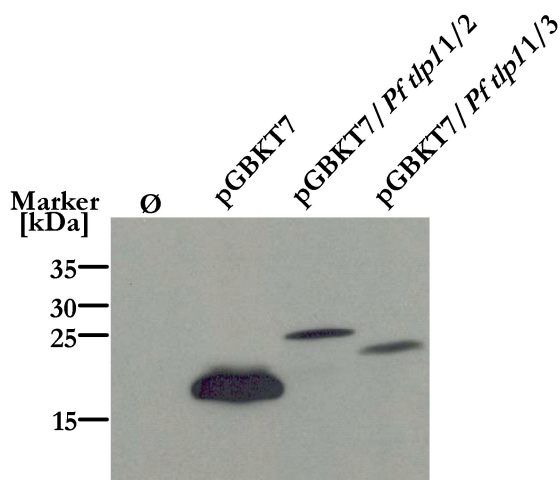
der Hefe getestet. Dazu wurde der gesamte C-terminale Bereich von TRAP als Fusion mit der Gal4-DNA-Bindedomäne kloniert. Allerdings wurde für dieses Konstrukt eine starke Autoaktivierung in dem Hefe-System festgestellt. Deshalb wurde die TRAP-CTD in der anderen Orientierung als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne für die direkte Interaktionsanalyse eingesetzt. Dies setzte wiederum die Klonierung der Aldolase als Gal4-DNA-Bindungsdomänen-Fusion und eine nicht vorliegende Fähigkeit zur Autoaktivierung dieses Konstrukts voraus. Dabei konnte lediglich ein schwaches Hintergrund-Wachstum auf SD-Trp-His-Platten festgestellt werden, das vernachlässigt werden konnte. Die im Anschluss getestete Interaktion zwischen Aldolase und der zytoplasmatischen Domäne von TRAP konnte mit dem *yeast-two-hybrid*-System nicht bestätigt werden. In zwei unabhängigen Experimenten konnten keine Transfektanden auf den SD-Trp-Leu-His-Ade-Platten wachsen, wohingegen auf den SD-Trp-Leu-Kontrollplatten Kolonien erhalten wurden.

Für Aldolase ist beschrieben, dass das Protein neben seiner enzymatischen Aktivität in der Glykolyse auch die Fähigkeit besitzt, filamentöses Aktin zu vernetzen (Schindler *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1997). Dabei kann jedes Monomer, der als Tetramer vorliegenden Aldolase, filamentöses Aktin binden (Wang *et al.*, 1997). Zusätzlich zu der Bindung von Aldolase an die zytoplasmatische Domäne von *Pf*TRAP bzw. *Tg* MIC2 konnten Jewett und Sibley (2003) zeigen, dass Aktin im Komplex mit Aldolase ko-immunopräzipitiert wird. In weiteren Analysen konnten die Autoren eine direkte Bindung von Aldolase an Aktin detektieren. Basierend darauf, wurde diese Interaktion mit Hilfe des *yeast-two-hybrid*-Systems untersucht. Die Interaktion von Aldolase und Aktin (*Pf* Aktin1) wurde jeweils in beiden Orientierungen analysiert, d.h. sowohl mit Aldolase als auch mit Aktin als Gal4-DNA-Bindedomänen-Fusion. In beiden Orientierungen konnte keine Interaktion zwischen den Proteinen festgestellt werden.

Durch die Verwendung des *yeast-two-hybrid*-System konnte die *in vitro* detektierte Bindung von Aldolase an die zytoplasmatische Domäne von TLP1 und auch von TRAP nicht bestätigt werden.

### 3.3 Identifizierung möglicher Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne von TLP1 mit dem *yeast-two-hybrid*-System

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Bindung von Aldolase an die zytoplasmatische Domäne von TLP1 *in vitro* und *in vivo* sollte mit Hilfe eines *yeast-two-hybrid-screening* nach möglichen/weiteren Interaktionspartner gesucht werden. Dazu wurde die in der direkten Interaktionsanalyse verwendete Fusion mit der Gal4-DNA-Bindedomäne, pGBKT7/*Pf tlp1* 1/2, als *bait* (Fänger) benutzt, da hier, bis auf das *sorting motif*, die gesamte C-terminale Domäne vorlag. Dieses Konstrukt wurde bereits auf die mögliche Fähigkeit zur Autoaktivierung getestet, die sich als negativ herausstellte (3.2.4). Um sicherzustellen, dass die Fusion in dem verwendeten Hefestamm AH109 exprimiert wird, wurden Proteinextrakte hergestellt und mit Hilfe von Western-Blot-Analysen untersucht (Abbildung 3.29). Die Detektion der Proteine wird



**Abb.3.29: Expressionsanalyse des *bait*-Konstrukts für das *yeast-two-hybrid-screening*.** Proteinextrakte von Hefezellen, die mit den *yeast-two-hybrid*-Vektoren transfiziert wurden, wurden auf einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und durch Western-Blot analysiert. Die exprimierten Fusionsproteine wurden mit einem Anti-*c-Myc*-Antikörper detektiert.

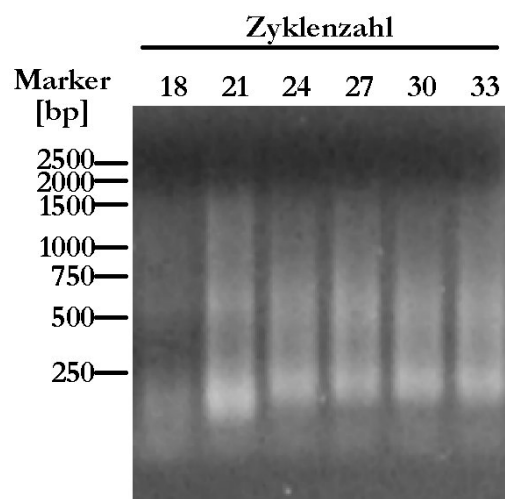
dadurch ermöglicht, dass diese als *c-Myc*-Fusionsproteine exprimiert werden. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Proteinextrakte des nicht-transfizierten Hefestamms AH109 (Negativ-Kontrolle) und des mit dem „leeren“ pGBKT7-Vektor transfizierten Hefestamms AH109 (Positiv-Kontrolle) hergestellt. Desweiteren wurde die in der direkten Interaktionsanalyse verwendete Fusion, pGBKT7/*Pf tlp1* 1/3, parallel analysiert. Die durch den pGBKT7-Vektor exprimierte DNA-Bindedomäne mit dem *c-Myc-tag* besitzt ein Molekulargewicht von zirka 18-19kDa, wohingegen die Fusionsproteine ein Molekulargewicht von zirka 24kDa bzw. 22kDa

aufweisen. Mit Hilfe dieser Western-Blot-Analyse konnte die Expression beider Gal4-DNA-Bindedomäne-Fusionen bestätigt werden (Abbildung 3.29).

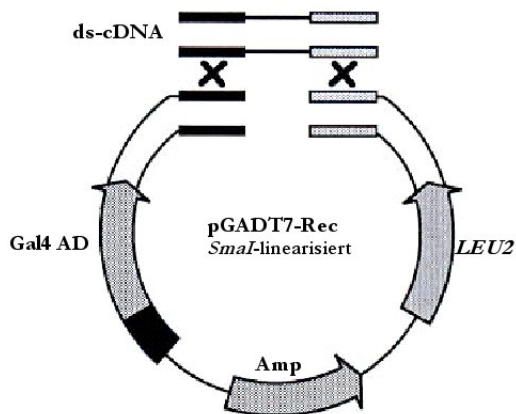
Um mögliche Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne von TLP1 zu identifizieren, wurde ausgehend von *Plasmodium falciparum* (HB3) Schizonten eine cDNA-Bibliothek synthetisiert. Dazu wurde aus einer synchronisierten Parasitenkultur die PolyA<sup>+</sup>-RNA isoliert und für die Erststrang-cDNA-Synthese eingesetzt. In der folgenden PCR wurde die Einzelstrang-cDNA zu einer Doppelstrang-cDNA-Bibliothek amplifiziert. Um eine möglichst heterogene cDNA-Population zu gewinnen, wurde zunächst die optimale Zyklenzahl für die PCR bestimmt (Abbildung 3.30). Aus dieser Bestimmung konnte eine optimale Zyklenzahl von 21 abgeleitet werden. Die unter diesen Bedingungen hergestellte Doppelstrang-cDNA-Bibliothek wurde im Anschluss über eine Gelchromatographie-Säule (Clontech) aufgereinigt, durch die cDNA-Fragmente  $\leq 200$ bp entfernt werden.

**Abb.3.30: Bestimmung der optimalen Zyklenzahl für die Amplifikation der Einzelstrang-cDNA.**

Es wurden jeweils 7 $\mu$ l der Doppelstrang-cDNA auf ein 1%-iges Agarosegel geladen. Nach 18 Zyklen wurde begonnen, ein Aliquot abzunehmen und fortgehend nach jeweils drei weiteren Zyklen, bis eine Gesamtzyklenzahl von 33 erreicht wurde.



Die konstruierte cDNA-Bibliothek rekombiniert *in vivo* mit dem linearisierten pGADT7-Rec-Vektor (Clontech). Durch diesen Schritt werden die cDNA-Fragmente mit der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. Die Rekombination wird dadurch gewährleistet, dass während der Erststrang-cDNA-Synthese spezifische Oligonukleotide an das 5'-und 3'-Ende angehängt werden. Die dazu homologen Sequenzen sind in dem pGADT7-Rec-Vektor enthalten (Abbildung 3.31).



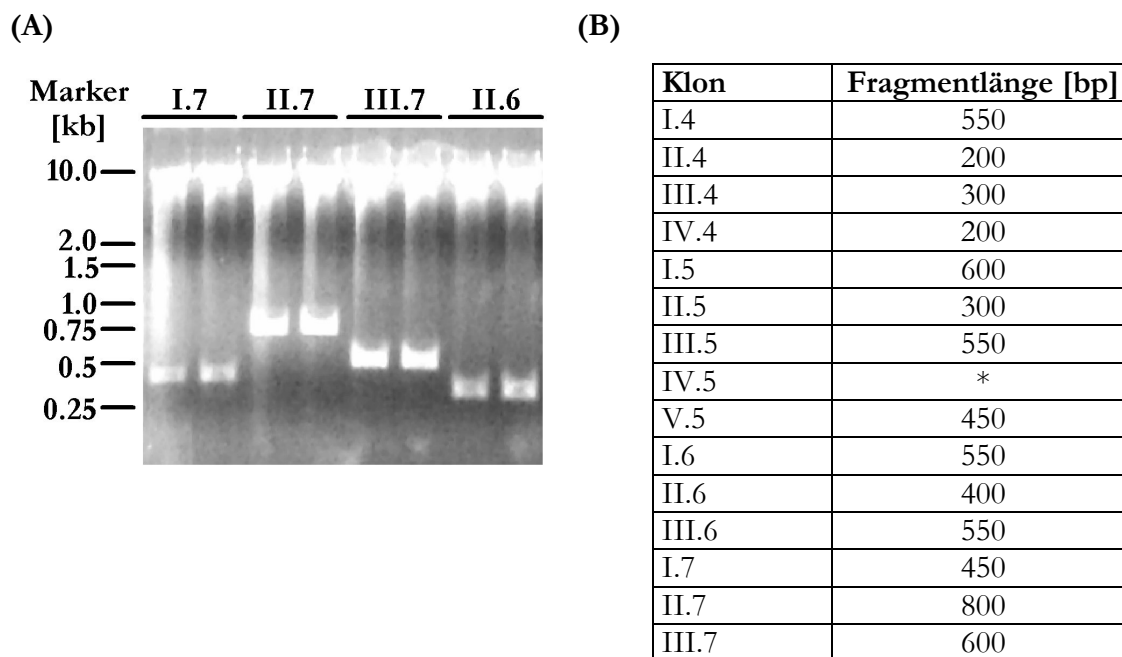
**Abb.3.31: Herstellung der Fusion zwischen der Gal4-AD und der cDNA-Bibliothek durch homologe Rekombination.** Für die Klonierung der cDNA in den pGADT7-Rec-Vektor werden die cDNA-Bibliothek und der *SmaI*-linearisierte Vektor in Hefe transfiziert. Durch Rekombination der markierten homologen Sequenzen jeweils am Ende der ds-cDNA und dem linearisierten Vektor wird das zirkuläre Plasmid hergestellt. Abkürzungen: Gal4 AD (Gal4-Aktivierungsdomäne); ds-cDNA (doppelsträngige cDNA-Bibliothek).

Nach der Transfektion in Hefe wird das linearisierte Plasmid durch Rekombination in die zirkuläre Form gebracht. Die erfolgreiche Plasmid-Rekonstruktion resultiert in positiven Leu2-Transfektanden.

Für das *Screening* wurden die cDNA-Bibliothek und der linearisierte pGADT7-Rec-Vektor in den *bait*-Hefestamm (*Γ7/Pf tlp1 tail1/2*) ko-transfiziert. Die erfolgreiche Aufnahme des Vektors bzw. die erfolgreiche Rekonstitution des Gal4 AD/cDNA-Expressionsvektor wurde durch Ausplattieren der Transfektanden auf SD-Leu bzw. SD-Trp-Leu Selektivplatten kontrolliert. Die Selektion auf mögliche Interaktionspartner wurde auf den Selektivplatten SD-Trp-Leu-His-Ade durchgeführt.

Die Effizienz der Transfektion für das *Screening* wurde mit Hilfe der SD-Trp-Leu-Platten ermittelt und konnte auf  $1,1 \times 10^6$  Kolonien berechnet werden. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden insgesamt 15 Kolonien von den Interaktions-Selektivplatten erhalten. Dabei konnten die ersten Kolonien nach 4 Tagen (I.4 - IV.4), weitere nach 5 Tagen (I.5 - V.5), nach 6 Tagen (I.6 - III.6) und nach 7 Tagen (I.7 - III.7) auf neue SD-Trp-Leu-His-Ade-Platten überimpft werden. Diese 15 positiven Interaktionen wurden im Folgenden analysiert. Zunächst wurden die jeweiligen Gal4 AD/cDNA-Plasmide aus den erhaltenen Hefe-Klonen isoliert. Das durch die Plasmid-Isolation erhaltene Gemisch aus *bait*- und AD/cDNA-Plasmid wurde in *E. coli* XL1-Blue-kompetente Zellen transformiert. Die Transformanden wurden auf Ampicillin-enthaltene Agarplatten ausplattiert, wodurch auf das AD/cDNA-Plasmid selektioniert wurde (das *bait*-Plasmid hat das Kanamycin-Resistenzgen). Aus jeweils zwei der erhaltenen Bakterien-Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit *EcoRI/BamHI* restringiert, wodurch das enthaltene cDNA-Fragment herausgeschnitten wurde. Dabei wurde geprüft, ob die AD-Plasmide der erhaltenen





**Abb.3.32: Analyse der isolierten AD/cDNA-Plasmide durch Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI*.**

Aus den positiven Hefe-Kolonien auf den Interaktions-Selektivplatten wurde die Plasmid-DNA isoliert, über eine Transformation in *E. coli* auf das AD-Plasmid selektiert und dieses nach erneuter Plasmid-Präparation auf das enthaltene cDNA-Insert getestet. Dazu wurden die AD/cDNA-Plasmide mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und auf einem 1%-igen Agarosegel analysiert. Es wurden Doppelbestimmungen pro Hefe-Klon für die Plasmid-Isolation aus *E. coli* gemacht. (A) Das Restriktionsmuster der AD-Plasmide von vier Klone ist dargestellt. (B) Zusammenfassung der durch diese Analyse erhaltenen cDNA-Fragmentgrößen aller Hefe-Klone. (\*) Es konnte kein cDNA-Fragment detektiert werden.

Hefe-Klone ein ähnliches Restriktionsmuster zeigen und somit auf ein eventuell identisches cDNA-Fragment geschlossen werden konnte. In Abbildung 3.32(A) ist ein solches Restriktionsmuster für die Klone I.7 – III.7 und II.6 als Beispiel dargestellt bzw. in Abbildung 3.32(B) sind die erhaltenen cDNA-Fragmentgrößen für alle Klone zusammengefasst. Aus der Übersicht geht hervor, dass einige Klone ähnliche Restriktionsmuster zeigten. Zur Identifizierung eines möglichen Interaktionspartners wurden die isolierten AD-Plasmide mit dem T7-Primer sequenziert (gatac-biotech, Konstanz).

Durch die Sequenzanalyse (PlasmoDB, TIGR, Sanger Institut, NCBI) wurde deutlich, dass es sich bei allen Sequenzen, die Homologien zu *P. falciparum* Sequenzen zeigten, um Falsch-Positive Klone handelte (Tabelle 3.4). In drei Fällen konnte keine Sequenzhomologie zu einem bekannten Gen gefunden werden bzw. bei drei weiteren Plasmiden war eine Sequenzierung aus technischen Gründen nicht möglich.

**Tabelle 3.4:** Ergebnisse der Sequenzanalyse der positiven Hefe-Klone aus dem *yeast-two-hybrid-screening* mit BLAST-Algorithmus.

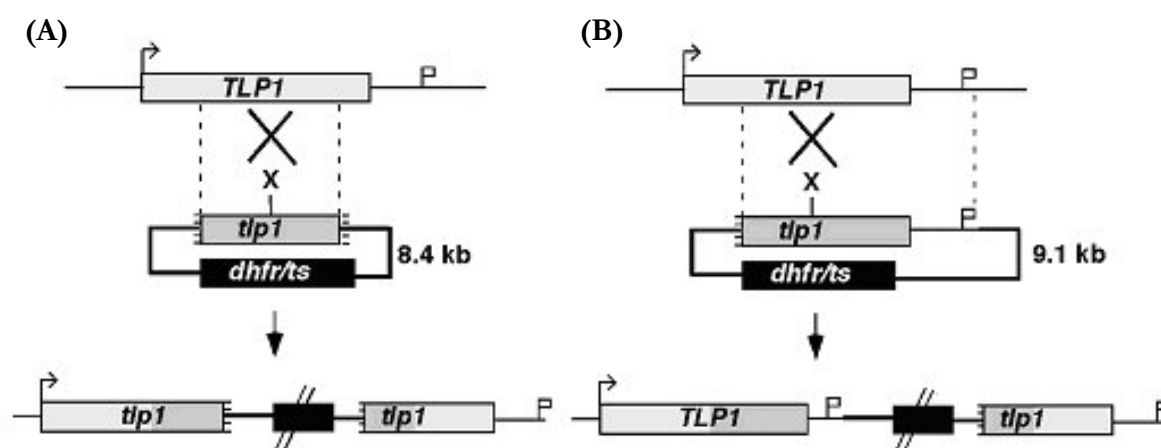
Ergebnis BLAST-Algorithmus/Sequenzvergleich	Anzahl Klone aus dem <i>yeast-two-hybrid-screening</i>
Chr.12; <i>eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10, putative</i> PFL0625c	8/15 (53,3%)
Chr.11; <i>hypothetical protein</i> PF11_0475	1/15 (6,7%)
Chr.8; <i>vacuolar proton-translocating ATPase subunit A, putative</i> PF08_0113	1/15 (6,7%)
Chr.7; <i>GTP-binding translocation elongation factor tu family protein, putative</i> PF07_0062	1/15 (6,7%)
Keine Homologien	1/15 (6,7%)
Sequenzierung nicht möglich	3/15

Ein möglicher Grund für das negative Ergebnis des *Screenings* könnte das Ausgangsmaterial für die cDNA-Bibliothek gewesen sein. Hierfür wurde eine synchronisierte *P. falciparum*-Kultur verwendet, in der vermehrt Schizonten vorhanden waren. Allerdings konnten auch schon einige Ringe und noch wenige Trophozoiten im Blutausschlag nachgewiesen werden. Nach den in dieser Arbeit gezeigten Expressionsdaten von *TLP1* können Transkripte in späten Trophozoiten und Schizonten (Abbildung 3.5 und 3.12) bzw. das Protein in Schizonten (Abbildung 3.11 und 3.13) detektiert werden. Trotz Synchronisation der Kultur ist es schwer, ausschließlich Schizonten anzureichern, da sich manche Parasiten schneller entwickeln und die Re-Invasion ein sehr schneller Prozess ist. Jedoch ist es möglich, die gebildeten Ringstadien durch Aufreinigung der Kultur über eine magnetische Säule zu entfernen. Somit kommt es zu einer starken Anreicherung der Schizonten bzw. der auch noch in der Kultur vorhandenen Trophozoiten. Um diese Aufreinigung durchzuführen, wurde eine *P. falciparum* (HB3)-Kultur im Ringstadium zunächst mit Sorbitol synchronisiert. Die Kultivierung erfolgte im Anschluss so lange, bis sich der Großteil der Parasiten zu segmentierten Schizonten entwickelt hatte. Die sich in dieser Zeit erneut gebildeten Ringstadien wurden dann durch die Magnet-Säule entfernt. Ausgehend von diesen angereicherten bzw. aufgereinigten Schizonten kann eine neue cDNA-Bibliothek synthetisiert werden und das *Screening* wiederholt werden.

### 3.4 TLP1 ist essentiell für die erythrozytären Stadien

Basierend auf der für *TLP1* dargestellten Expression des Proteins in den erythrozytären Stadien sollte untersucht werden, ob das Protein eine essentielle Funktion in diesem Stadium des *Plasmodium*-Lebenszyklus ausübt. Um dies zu analysieren wurde erneut das *P. berghei*-

Transfektionssystem (van Dijk *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1997; Menard und Janse, 1997) verwendet, wobei hier das endogene *TLP1*-Gen in Blutstadien deletiert werden sollte. Die zur Inaktivierung des endogenen *TLP1*-Gens verwendete Integrations-Strategie ist in Abbildung 3.33(A) dargestellt. Dazu wurde eine 5'- und 3'-verkürzte Sequenz des *TLP1*-Gens in den b3D.DT<sup>H</sup>.D-Transfektionsvektor kloniert (pKH11). Das durch *Xba*I-linearisierte Konstrukt führt in *P. berghei* zu einer homologen Rekombination mit dem endogenen *TLP1*-Gen, wobei ein einfaches Rekombinationsereignis stattfindet. Dadurch wird eine deletierte Version von *TLP1* in das Genom des Parasiten eingeführt. Der durch die Integrations-Strategie duplizierte Gen-Lokus enthält somit zwei, aufgrund des Fehlens der 3'UTR, die für die Expression und Stabilität der mRNA notwendig ist, bzw. der Promotorregion und Startkodon, nicht-funktionelle Kopien des *TLP1*-Gens.



**Abb.3.33: Schematische Darstellung der Integrations-Strategie von *TLP1* in das Genom von *P. berghei*.** (A) Integrations-Strategie für die Deletion von *TLP1*. Der Wildtyp-Lokus des endogenen *TLP1*-Gens ist oben dargestellt. Dabei repräsentiert der Pfeil das Startkodon und die Fahne das Stoppkodon. Das darunter gezeigte Integrationskonstrukt enthält eine 5'- und 3'-verkürzte Version des *TLP1*-Gens und den Selektionsmarker *dhfr/ts*. Die mit X-markierte Stelle signalisiert die *Xba*I-Schnittstelle. Unten ist der rekombinante Integrationsloкус dargestellt. Durch ein einfaches *Crossing-over* wird das linearisierte Plasmid inseriert und dabei der endogene *TLP1*-Lokus dupliziert. Die beiden entstandenen Versionen des *TLP1*-Gens sind nicht funktionell, da bei der 5'-terminalen Version die 3'UTR und bei der 3'-terminalen Version der Promotorbereich und das Startkodon fehlen. (B) Integrations-Strategie für das Kontrollkonstrukt. Das hier verwendete Integrationskonstrukt enthält eine 5'-verkürzte Version des *TLP1*-Gens und den Selektionsmarker *dhfr/ts*. Im Vergleich zu dem unter (A) beschriebenen Konstrukt ist der 3'-terminale Bereich der *TLP1*-Sequenz verlängert. Der durch homologe Rekombination entstandene duplizierte *TLP1*-Gen-Lokus enthält nun eine funktionelle 5'-terminale Version von *TLP1* bzw. eine nicht-funktionelle, im Promotorbereich deletierte, Version des Gens.

Zur Kontrolle wurde ein weiteres Integrationskonstrukt (pKH12) hergestellt, wodurch bestätigt werden sollte, dass der endogene *TLP1*-Gen-Lokus prinzipiell nicht gegenüber *gene targeting* resistent ist (Abbildung 3.33(B)). Dabei unterscheidet sich das verwendete Konstrukt von dem oben beschriebenen Deletionskonstrukt (Abbildung 3.33(A)) ausschließlich im 3'-Bereich, der hier vollständig vorliegt. Der durch ein einfaches Rekombinationsereignis entstandene duplizierte Gen-Lokus, enthält in diesem Fall eine funktionelle Kopie des *TLP1*-Gens und eine nicht-funktionelle, 5'-verkürzte Version des Gens.

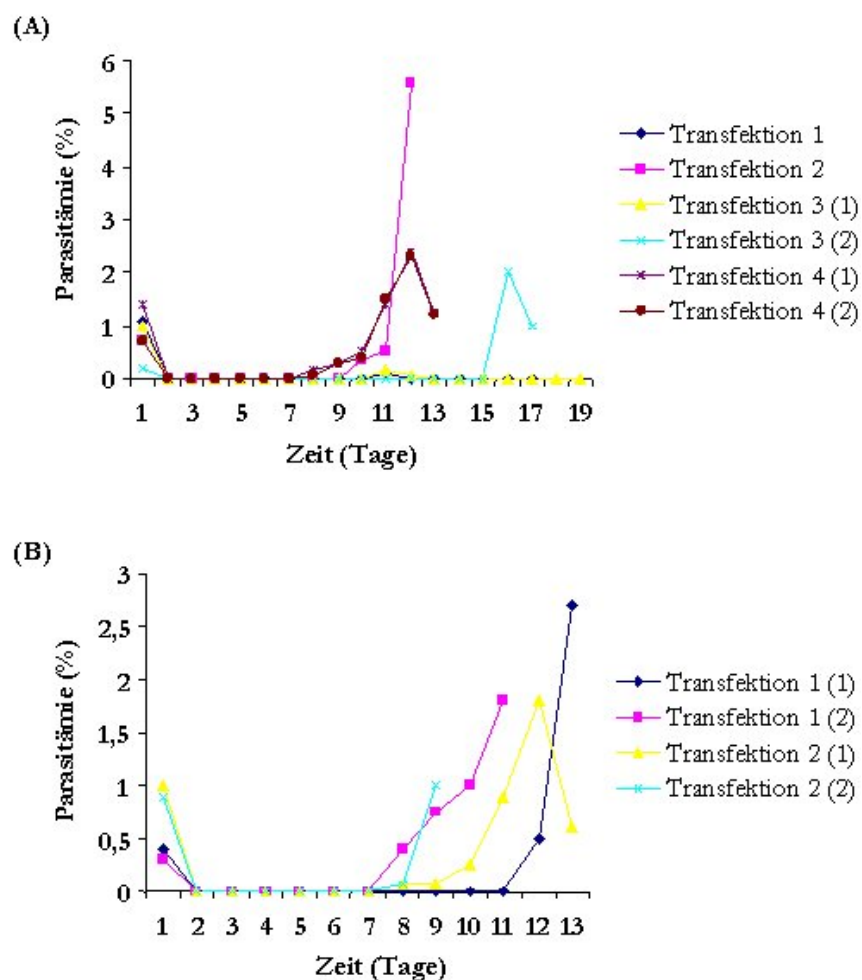
### 3.4.1 Konstruktion der Transfektionsvektoren pKH11 und pKH12 und Transfektion

Für das Deletionskonstrukt wurden zunächst zwei Fragmente der internen Sequenz des *TLP1*-Gens durch PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primerkombinationen *Pb tlp1for1/Pb tlp1rev2* und *Pb tlp1for3/Pb tlp1rev4* verwendet, durch die ein 5'-Fragment von zirka 458bp bzw. ein 3'-Fragment von zirka 429bp erzeugt wird. Für diese PCR-Amplifikation diente genomische DNA von *P. berghei* NK65 als Matrize. Es folgte eine in zwei Schritten ablaufende Klonierung der Fragmente in den b3D.DT<sup>H</sup>.D-Transfektionsvektor, wobei zuerst das 5'-Fragment (*Bam*HI/*Xba*I) in den Vektor ligiert wurde. Ausgehend von diesem Zwischenkonstrukt wurde das 3'-Fragment (*Xba*I/*Sac*II) direkt hinter das 5'-Fragment kloniert, wodurch eine künstliche *Xba*I-Schnittstelle eingeführt wurde. Daraus resultierte das Transfektionskonstrukt pKH11.

Für das Kontrollkonstrukt wurde ein zirka 1099bp 3'-Fragment (*Xba*I/*Sac*II) durch die Primerkombination *Pb tlp1for3/Pb tlp1test1rev* amplifiziert, wobei genomische DNA von *P. berghei* NK65 als Matrize verwendet wurde. Dieses wurde in das oben generierte Zwischenkonstrukt, das das 5'-Fragment enthält, kloniert. Durch diesen Schritt wurde auch hier eine künstliche *Xba*I-Schnittstelle eingeführt. Es resultierte das Transfektionskonstrukt pKH12.

Wie schon bei der TRAP-CTD-Komplementations-Analyse (3.2.1.2) beschrieben, wurden die Schizonten-Stadien des *P. berghei* Stammes NK65 durch Elektroporation transfiziert und in Ratten injiziert. Dazu wurden 70µg DNA der mit *Xba*I-linearisierten Konstrukte pKH11 bzw. pKH12 eingesetzt. Ein Tag nach der Elektroporation wurde mit der Behandlung der Tiere mit Pyrimethamin begonnen und somit auf die rekombinanten Parasiten selektioniert. Pyrimethamin-resistente Parasiten-Populationen (zwischen Tag 8 und Tag 16) wurden zur weiteren Selektion in naive Tiere transferiert und die parentalen Tiere weiter behandelt. Auch die nach 2-5 Tagen detektierten Parasiten in den Transfer-Tieren wurden einer weiteren Selektion mit Pyrimethamin unterzogen.

Insgesamt wurde das Deletionskonstrukt (pKH11) in 4 unabhängigen Experimenten transfiziert bzw. in 2 der 4 Experimenten parallel mit dem Kontrollkonstrukt (pKH12). Für jedes Transfektions-Experiment wurden zwei Ratten verwendet. In Abbildung 3.34 ist der Verlauf der Transfektionen für die parentalen Tiere beider Konstrukte dargestellt (Daten für die Transfer-Tiere nicht gezeigt).

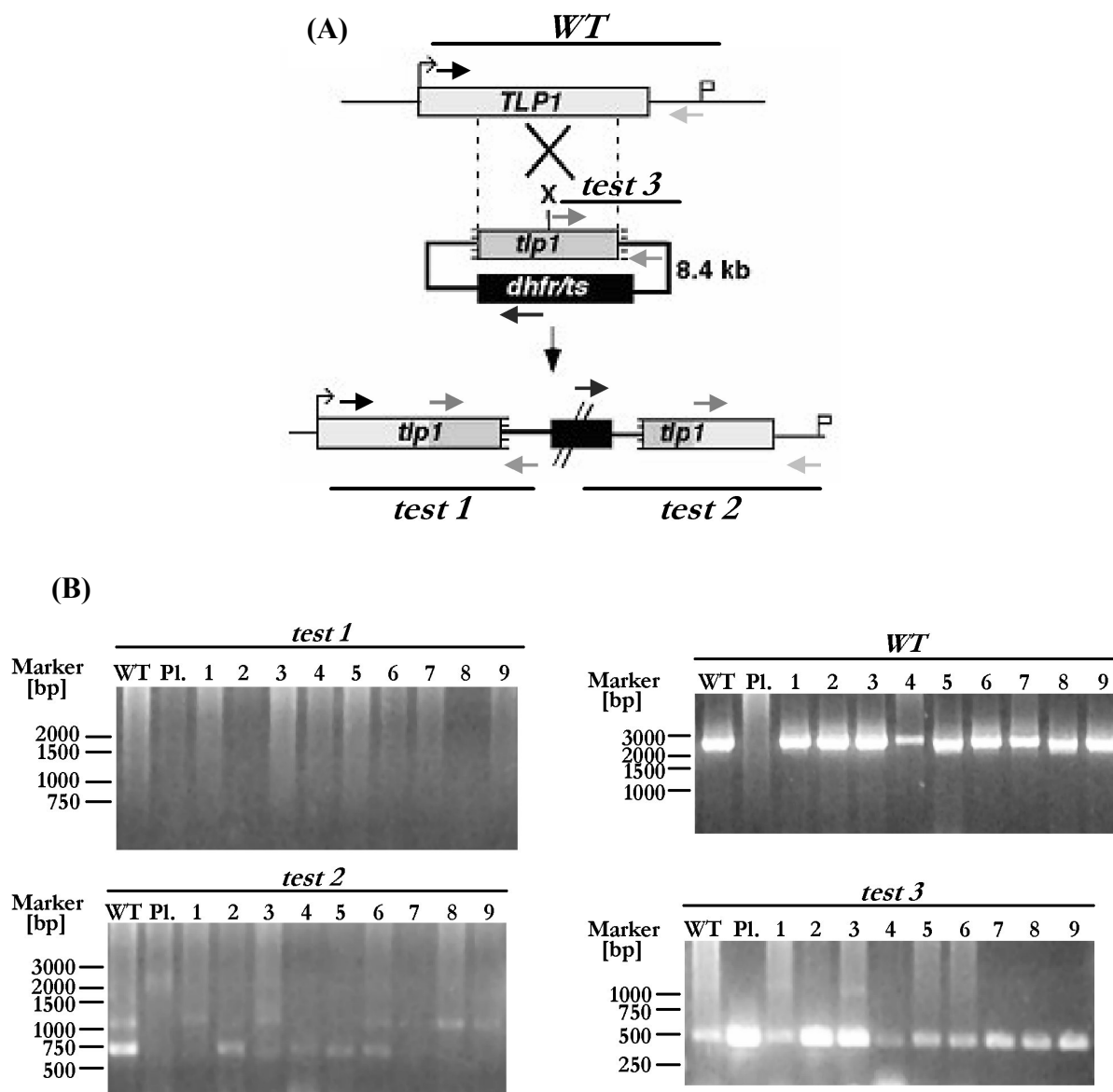


**Abb.3.34: Parasitämie-Verlauf des TLP1-Deletions- und Kontrollkonstruktes.** (A) Parasitämie-Verläufe der parentalen Ratten der Transfektionen des TLP1-Deletionskonstruktes (pKH11). (B) Parasitämie-Verläufe der parentalen Ratten der Transfektionen des TLP1-Kontrollkonstruktes (pKH12). Die Anfangsparasitämie wurde 24 Stunden nach der Elektroporation bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch mit der Pyrimethamin-Behandlung begonnen, wodurch die Parasitämie sinkt bzw. keine Parasiten mehr nachgewiesen werden konnten. Erste resistente Parasiten wurden nach unterschiedlichen Tagen nach der Elektroporation detektiert (zwischen Tag8 bis Tag16) und in naive Tiere transferiert (nicht gezeigt). Abkürzungen: (1) Ratte1; (2) Ratte2.

Bei den ersten beiden Transfektionen des Deletionskonstruktes konnten einen Tag nach der Elektroporation bei jeweils einer Ratte keine Parasiten detektiert werden. Ein möglicher Grund

dafür können Probleme bei der intravenösen Applikation der Parasiten gewesen sein. Durch die Behandlung mit Pyrimethamin konnten vier resistente Parasiten-Populationen selektioniert werden (Transfer-Tiere nicht mit einbezogen). Die erst 16 Tage nach der Elektroporation bei der Transfektion 3 (2) detektierten Parasiten wurden dabei keiner weiteren Selektion unterzogen. Bei zwei der sechs parentalen Tiere konnten nach 11 Tagen Parasiten detektiert werden (Transfektion 1; Transfektion 3 (1)). Allerdings handelte es sich hier wahrscheinlich um Wildtyp-Parasiten, da sich diese Populationen nach weiterer Pyrimethamin-Behandlung nicht weiterentwickeln konnten. Aus den beiden Transfektionen des Kontrollkonstruktes (pKH12) konnten vier resistente Parasiten-Populationen selektioniert werden (Transfer-Tiere nicht mit einbezogen), wobei hier die erst nach 12 Tagen detektierten Parasiten im Falle der Transfektion 1 (1) keiner weiteren Pyrimethamin-Selektion unterzogen wurden.

Zur Analyse der durch Pyrimethamin-Behandlung selektionierten Parasiten-Populationen wurde jeweils die genomische DNA isoliert und mit Hilfe einer integrations-spezifischen PCR genotypisiert. Hierbei sollte sichergestellt werden, dass der Anstieg der Parasitämie in Anwesenheit des Selektionsmittels auf eine Integration der Konstrukte in das Genom des Parasiten zurückzuführen ist. Es besteht die Möglichkeit, wie unter 3.2.1.2 schon beschrieben, dass die Plasmide episomal vorliegen und so den Parasiten Resistenz gegenüber Pyrimethamin verleihen. Dazu wurden für beide Konstrukte bzw. rekombinanten Gen-Loki spezifische Primerkombinationen gewählt, mit denen die Integration, das Vorliegen des Transfektionskonstruktes als Episom oder das Vorliegen der Wildtyp-Situation detektiert werden können. Diese Analyse ist in Abbildung 3.35 für die nach der Transfektion des TLP1-Deletionskonstruktes erhaltenen resistenten Parasiten dargestellt. Mit den unter (A) gezeigten Primerkombinationen *test 1* (*Pb tlp1*zwfor/T7 rev) und *test 2* (*TgDHFR/TSfor/Pb tlp1 test1rev*) kann die Integration des Transfektionskonstruktes in den endogenen *TLP1*-Gen-Lokus und damit die Ausschaltung von *TLP1* bestätigt werden. Durch PCR sollte hier im Falle des rekombinanten Gen-Lokus mit der *test 1*-Kombination ein spezifisches Fragment von zirka 1828bp und mit der *test 2*-Kombination ein 2057bp-Fragment amplifiziert werden. Allerdings konnten diese bei keiner der erhaltenen resistenten Parasiten-Populationen detektiert werden, d.h. es konnten keine *TLP1*(-)-Parasiten erzeugt werden. Mit der Primerkombination *test 2* wurden zum Teil Fragmente der Größe 1000bp bzw. 800bp amplifiziert. Diese sind allerdings auch bei der genomischen DNA-Kontrolle von *P. berghei* Wildtyp-Parasiten zu sehen, obwohl durch diese Kombination von Oligonukleotiden hier kein Fragment amplifiziert werden sollte, da der



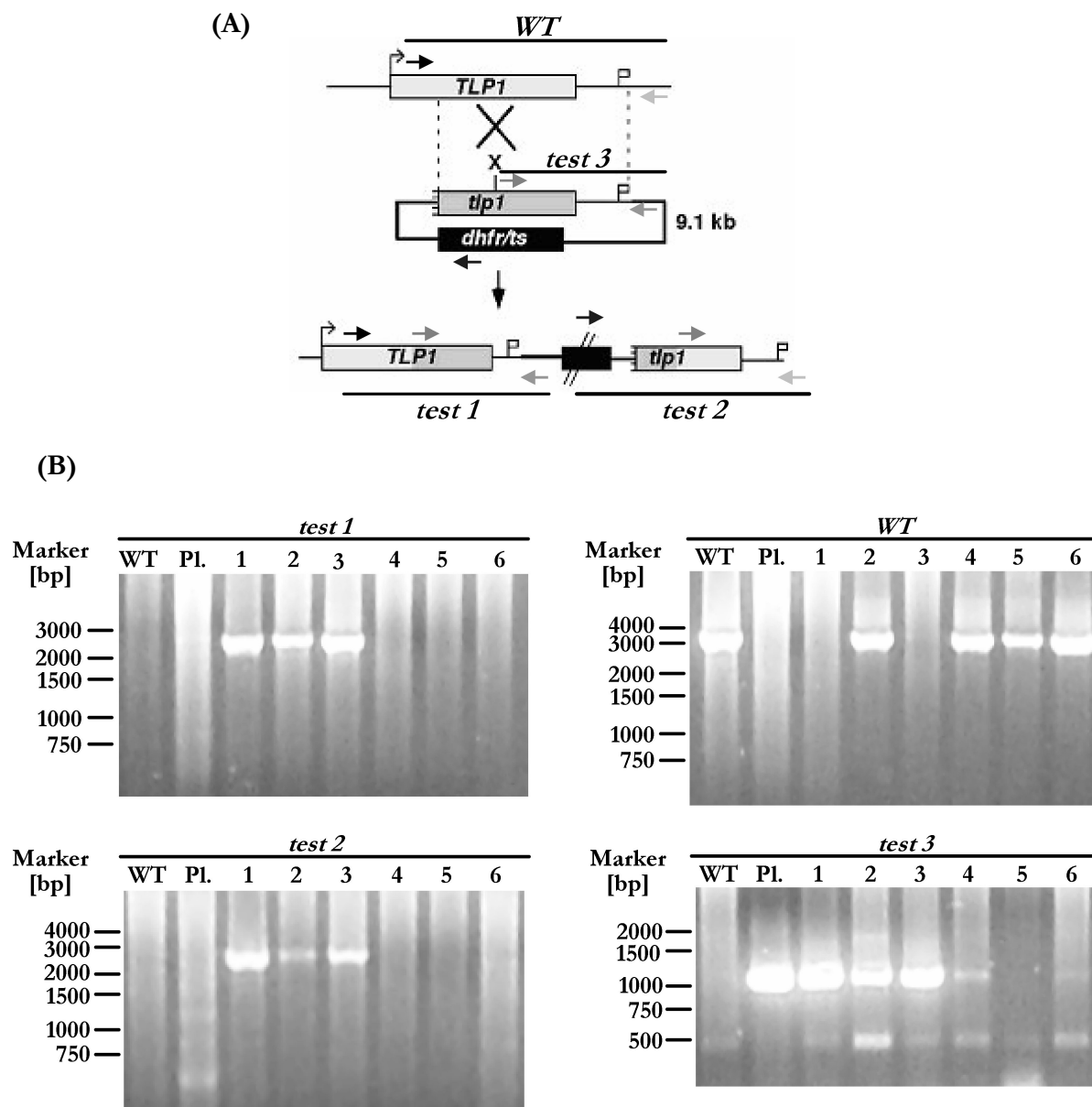
**Abb.3.35: Integrations-spezifische PCR-Analyse der resistenten Parasiten-Populationen nach Transfektion des TLP1-Deletionskonstruktes.** Unter (A) ist eine allgemeine schematische Übersicht des rekombinanten Gen-Lokus, nach erfolgter Integration des Deletionskonstruktes (pKH11), dargestellt. Durch die verschiedenen Pfeile werden zum einen die spezifischen Primerkombinationen zum Nachweis der Integration (*WT*, *test 1*, *test 2*, *test 3*) gezeigt und zum anderen die möglichen Hybridisierungsmöglichkeiten der Oligonukleotide im Wildtyp-Lokus des endogenen *TLP1*-Gens, dem Transfektionsplasmid und dem rekombinanten Gen-Lokus. Die Striche *test 1*, *test 2*, *test 3* und *WT* symbolisieren dabei die amplifizierten PCR-Fragmente. (B) Integrations-spezifische PCR. Es ist die PCR-Analyse mit den unter (A) beschriebenen Primerkombinationen für alle erhaltenen resistenten Parasiten-Populationen dargestellt, wobei bei keiner eine Integration nachgewiesen werden konnte. Abkürzungen: *WT* (genomische DNA von *P. berghei* Wildtyp-Parasiten); *Pl.* (Plasmid-DNA); 1-9 (genomische DNA der Parasiten aus den parentalen Ratten und den Transfer-Tieren aus 4 unabhängigen Transfektionen).

verwendete *Forward*-Primer im *TgDHFR/TS*-Selektionsmarker hybridisiert. Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich um unspezifisch amplifizierte PCR-Fragmente. Mit Hilfe der Primerkombination *WT* (2531bp PCR-Fragment; *Pb tlp1zwfor/Pb tlp1 test1rev*) konnte deutlich gezeigt werden, dass bei allen isolierten Parasiten-Populationen ausschließlich der Wildtyp-Gen-Lokus vorlag. Durch das als Episom (*test 3; Pb tlp1for3/T7 rev*) vorliegende Integrationskonstrukt wurde den Parasiten Resistenz gegenüber Pyrimethamin verliehen. Das hier erwartete Fragment mit einer Größe von zirka 429bp konnte bei allen getesteten genomischen DNAs detektiert werden. Mit dieser Primerkombination könnte auch ein Fragment gleicher Größe von dem rekombinanten Locus amplifiziert werden (Abbildung 3.35(A)). Dies kann aber durch die mit *test 1* und *2* negativen Ergebnissen ausgeschlossen werden. Das durch *test 3* bei der Kontrolle mit genomischer DNA von *P. berghei* Wildtyp-Parasiten erhaltene PCR-Fragment wurde nicht erwartet, da hier der verwendete *Reverse*-Primer nicht hybridisieren sollte. Womöglich liegt eine unspezifische PCR-Amplifikation vor.

Die Genotypisierung der nach der Transfektion des Kontrollkonstruktes (pKH12) erhaltenen resistenten Parasiten-Populationen ist in Abbildung 3.36 gezeigt. In Abbildung 3.36(A) sind die verwendeten Primerkombinationen dargestellt, mit denen spezifisch die Integration (*test 1* und *test 2*), das Vorliegen des Wildtyp-Gen-Lokus (*WT*) und das Vorliegen des Transfektionskonstruktes als Integration bzw. Episom (*test 3*) nachgewiesen werden können. Durch die Primerkombinationen *test 1* (*Pb tlp1zwfor/T7 rev*; 2531bp PCR-Fragment) und *test 2* (*Tg DHFR/TSfor/Pb tlp1 test2rev*; 2555bp PCR-Fragment) konnte bei drei der sechs erhaltenen resistenten Parasiten-Populationen (1-3) die Integration des Kontrollkonstruktes in das Genom von *P. berghei* bestätigt werden. Dabei konnte bei zwei dieser Populationen (1 und 3) kein verbleibender *TLP1*-Wildtyp-Gen-Lokus mehr nachgewiesen werden (*WT*-Primerkombination). Mit der für den Wildtyp-*TLP1*-Gen-Lokus spezifischen PCR (*Pb tlp1zwfor/Pb tlp1 test2rev*; 3029bp PCR-Fragment) konnte für die weiteren resistenten Parasiten-Populationen (4-6), für die keine Integration detektiert werden konnte, der Wildtyp-Lokus bestätigt werden. Auch hier wurde die Resistenz gegenüber Pyrimethamin durch das als Episom (*test 3; Pb tlp1for3/T7 rev*) vorliegende Integrationskonstrukt verliehen. Das erwartete PCR-Fragment mit einer Größe von zirka 1099bp konnte, mit Ausnahme der Population 5, bei allen analysierten genomischen DNAs amplifiziert werden. Bei der Population 5 besteht die Möglichkeit einer, wahrscheinlich durch Mutation entstandenen, resistenten Wildtyp-Population.

Durch die *test 3*-Kombination wurden außerdem PCR-Fragmente mit einer Größe von zirka 500bp amplifiziert. Ein Fragment dieser Größe konnte auch bei genomischer DNA von *P. berghei* Wildtyp-Parasiten detektiert werden, obwohl der verwendete *Reverse*-Primer hier nicht





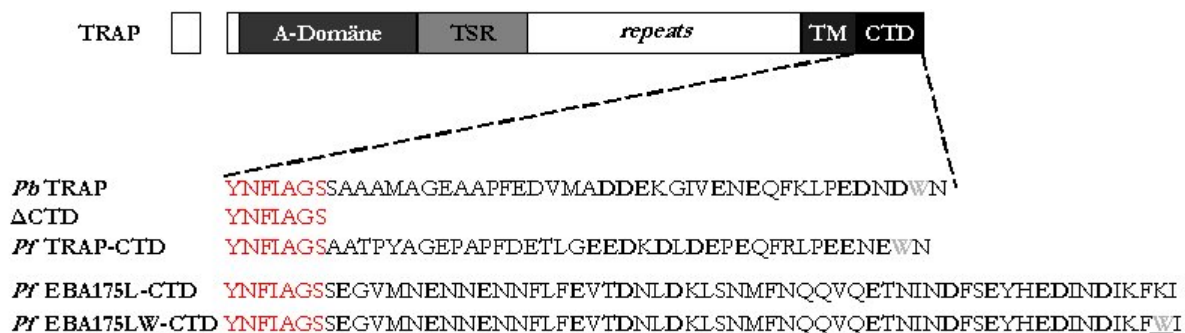
**Abb.3.36: Integrations-spezifische PCR-Analyse der resistenten Parasiten-Populationen nach Transfektion des TLP1-Kontrollkonstruktes.** (A) Gezeigt ist die schematische Übersicht des rekombinanten Gen-Lokus nach erfolgter Integration des Kontrollkonstruktes (pKH12). Durch die verschiedenen Pfeile werden die spezifischen Primerkombinationen zum Nachweis der Integration, des Wildtyp-Gen-Lokus oder des Episoms (*WT*, *test 1*, *test 2*, *test 3*) und die möglichen Hybridisierungsmöglichkeiten der Oligonukleotide im Wildtyp-Lokus des endogenen *TLP1*-Gens, dem Transfektionsplasmid und dem rekombinanten Gen-Lokus dargestellt. Die Striche *test 1*, *test 2*, *test 3* und *WT* symbolisieren dabei die amplifizierten PCR-Fragmente. (B) Integrations-spezifische PCR. Dargestellt ist die PCR-Analyse mit den unter (A) beschriebenen Primerkombinationen für alle erhaltenen resistenten Parasiten-Populationen. Abkürzungen: *WT* (genomische DNA von *P. berghei* Wildtyp-Parasiten); *Pl.* (Plasmid-DNA); 1-6 (genomische DNA der Parasiten aus den parental Ratten und den Transfer-Tieren aus 2 unabhängigen Transfektionen).

hybridisieren sollte. Aufgrund dessen sind diese Fragmente höchstwahrscheinlich auf unspezifische PCR-Amplifikationen zurückzuführen.

In vier unabhängigen Transfektionsexperimenten konnte das *TLP1*-Gen nicht deletiert werden. Allerdings konnten mit dem Kontrollkonstrukt rekombinante Parasiten generiert werden, wodurch eine Resistenz des *TLP1*-Gen-Lokus gegenüber *gene targeting* ausgeschlossen werden konnte.

### 3.5 Funktionelle Trennung von EBA175 von den Invasinen der TRAP-Proteinfamilie

Es werden einige Proteine diskutiert, die wahrscheinlich an der Invasion von Erythrozyten durch Merozoiten beteiligt sind. Dazu gehören Mitglieder der EBL (*erythrocyte binding ligand*)-Familie (Camus und Hadley, 1985; Adams *et al.*, 2001), wobei hier EBA175 (*erythrocyte binding protein 175*) am besten charakterisiert ist. Für dieses Protein konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne von TRAP die entsprechende Region von EBA175 ersetzen kann (Gilberger *et al.*, 2003). Diese EBA175/TRAP-Parasiten zeigten ein zu Wildtyp-Parasiten normales Invasionsverhalten in Erythrozyten. Basierend auf dieser Arbeit sollte im Folgenden untersucht werden, ob die C-terminale Domäne von EBA175 die entsprechende Region von TRAP komplementieren kann. Um dies zu testen wurde die unter 3.2 beschriebene Komplementations-Analyse in *P. berghei* verwendet, durch die gezeigt wurde, dass die zytoplasmatischen Domänen der Proteine CTRP und TLP1 die entsprechende Region von TRAP in ihrer Funktion ersetzen können. Dadurch konnten beide Proteine als funktionelle Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert/klassifiziert werden. Basierend darauf wurden zwei TRAP/EBA175-CTD-*swap*-Mutanten hergestellt (Abbildung 3.37). Dabei wurde einerseits die gesamte zytoplasmatische Domäne von *Pf*EBA175 an TRAP- $\Delta$ CTD fusioniert und andererseits eine durch den Austausch einer Aminosäure veränderte Version. Bei letzterer wurde das bei Proteinen der TRAP-Familie konservierte (und für die Invasion essentielle) Tryptophan durch Punktmutation (K $\rightarrow$ W) eingeführt (Abbildung 3.37). Als Negativ-Kontrolle wurde auf die unter 3.2 analysierte  $\Delta$ CTD-Mutante bzw. als Positiv-Kontrolle auf die *Pf*TRAP-CTD-Mutante zurückgegriffen, die nochmals in Abbildung 3.37 dargestellt sind.



**Abb.3.37: Schematische Darstellung der EBA175-CTD-Komplementations-Experimente.**

Dargestellt ist die C-terminale Domäne (CTD) von *P. berghei* TRAP; die verwendete Negativ-Kontrolle ΔCTD; die Positiv-Kontrolle *Pf*TRAP-CTD und die beiden *Pf*EBA175-CTD-Varianten. Bei *Pf* EBA175LW-CTD wurde durch Punktmutation ein Tryptophan an vorletzter Position eingeführt (grau/unterstrichen). Die in den zytoplasmatischen Domänen vorkommenden negativ geladenen Aminosäuren sind in schwarz bzw. das bei Proteinen der TRAP-Familie konservierte Tryptophan in grau hervorgehoben. Abkürzungen: TSR (*thrombospondin type I repeat*); TM (Transmembrandomäne); CTD (*cytoplasmic tail domain*); TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*); EBA175 (*erythrocyte binding protein 175*).

### 3.5.1 Herstellung der *P. berghei* TRAP/EBA175-CTD-*swap*-Parasiten

#### 3.5.1.1 Konstruktion der Transfektionsvektoren für die TRAP/EBA175-CTD-Komplementationen

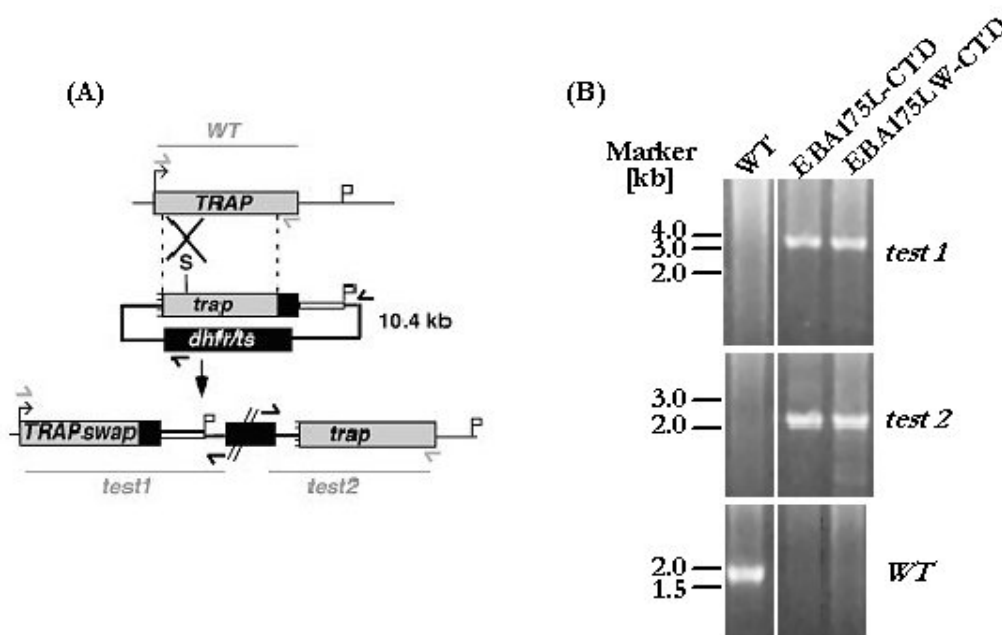
Die zytoplasmatische Domäne von *Pf*EBA175 wurde durch PCR amplifiziert (*Thomas M. Daly und Lawrence W. Bergman, Philadelphia, USA*). Ebenso wurde die Punktmutation beinhaltende Version der zytoplasmatischen Domäne von EBA175 durch PCR gewonnen. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit *Bam*HI und *Xba*I geschnitten und nach Aufreinigung in den unter 3.2.1.1 beschriebenen Integrations-Vektor pKH01 kloniert. Daraus resultierten die Plasmide NZ035/*Pf*EBA175L-CTD und NZ036/*Pf*EBA175LW-CTD.

#### 3.5.1.2 Gewinnung der TRAP/EBA175-CTD-*swap*-Parasiten

Zur Gewinnung der EBA175-*swap*-Parasiten wurde das *P. berghei*-Transfektionssystem herangezogen. In Anlehnung an die im Abschnitt 3.2.1.2 generierten *swap*-Parasiten wurde die gleiche Integrations-Strategie verwendet (Abbildung 3.18) und die folgende Transfektion wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die durch Selektion mit Pyrimethamin gewonnenen resistenten Parasiten-Populationen wurden genotypisch analysiert. Die Parasiten-Population, bei der der rekombinante Gen-Lokus nachgewiesen werden konnte, wurde zur weiteren Selektion einer klonalen Population eingesetzt.

### 3.5.1.3 Genotypische Analyse der TRAP/EBA175-CTD-*swap*-Parasiten

Um zu überprüfen, ob bei den gewonnenen Klonen keine Kontamination durch Wildtyp-Parasiten vorliegt, wurde die genomische DNA dieser klonalen Populationen genotypisch analysiert. Die dazu durchgeführte integrations-spezifische PCR basierte auf der in Abbildung 3.20 erläuterten Strategie zum Nachweis der klonalen Population der dort generierten TRAP-CTD-*swap*-Parasiten. Die genotypische Analyse jeweils einer der gewonnenen Klone der TRAP/EBA175-CTD-Parasiten ist in Abbildung 3.38 gezeigt. Zur besseren Übersicht ist das Schema des rekombinanten Gen-Lokus nach erfolgter Integration des Transfektionskonstruktes und die spezifischen Primerkombinationen zum Nachweis der klonalen Population nochmals mit aufgeführt (Abbildung 3.38(A)).



**Abb.3.38: Integrations-spezifische PCR-Analyse der klonalen TRAP/EBA175-CTD-*swap*-Parasiten.** (A) Gezeigt ist das Schema des rekombinanten Gen-Lokus nach erfolgter Integration der jeweiligen Transfektionskonstrukte. Die Pfeile symbolisieren die spezifischen Primerkombinationen zum Nachweis der Integration bzw. der klonalen Population (*test 1*, *test 2* und *WT*) und die möglichen Hybridisierungsmöglichkeiten der Oligonukleotide im Wildtyp-Lokus des *TRAP*-Gens, dem Transfektionsplasmid und dem rekombinanten Gen-Lokus. Die Striche (*test 1*, *test 2* und *WT*) entsprechen den mit diesen Primerkombinationen amplifizierten PCR-Fragmenten. (B) Integrations-spezifische PCR mit den unter (A) beschriebenen Primerkombinationen. Gezeigt ist jeweils eine klonale Population der TRAP/EBA175-CTD-*swap*-Parasiten, die die erfolgreiche Integration am *TRAP*-Lokus aufweisen. Bei beiden Populationen konnte kein *WT*-spezifisches PCR-Fragment nachgewiesen werden und somit der klonale Ursprung der rekombinanten *swap*-Parasiten belegt werden. Abkürzungen: *WT* (Wildtyp), *S* (*SpeI*-Schnittstelle).

Durch die Abwesenheit eines Wildtyp-spezifischen PCR-Fragments konnte das Vorliegen der jeweiligen klonalen Population bestätigt werden (Abbildung 3.38(B)). Diese wurden für die weiteren Analysen verwendet. Die insgesamt aus den beiden Klonierungen gewonnenen Klone sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Diese sind genotypisch identisch, wurden aber in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

**Tabelle 3.5: Übersicht über die gewonnenen klonalen TRAP/EBA175-CTD-*swap*-Populationen aus der entsprechenden Klonierung.**

Parasit	<i>Pf</i> EBA175L-CTD	<i>Pf</i> EBA175LW-CTD
# Klone	5	7

### 3.5.2 Phänotypische Charakterisierung der *P. berghei* TRAP/EBA175-*swap*-Parasiten

Basierend auf der phänotypischen Charakterisierung der in dieser Arbeit beschriebenen TRAP-CTD-*swap*-Parasiten (3.2.2) sollte im Folgenden das Invasionsverhalten der TRAP/EBA175-CTD-*swap*-Parasiten analysiert werden. Dabei wurde untersucht, ob diese Parasiten fähig sind, sowohl die Speicheldrüsen im Moskito-Vektor als auch die Hepatozyten im Säugetier-Wirt zu infizieren.

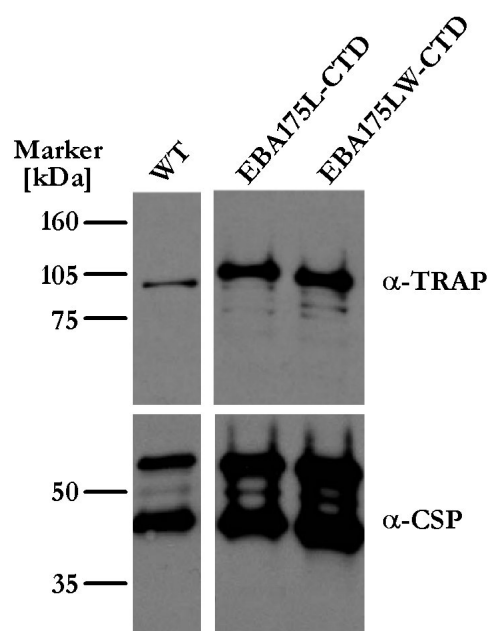
Wie erwartet hatte die Modifikation des TRAP-Proteins auf die Übertragung der klonalen Parasiten-Populationen auf Moskitos keinen Einfluss. Es konnten keine Unterschiede zu Wildtyp-Parasiten bezüglich des Wachstums der Blutstadien-Parasiten, der Bildung von Gametozyten und Exflagellation der Mikrogamonten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen wurde zunächst sichergestellt, dass die TRAP-Varianten eine zu Wildtyp-Parasiten vergleichbare Expression des Proteins aufweisen. Dazu wurden Mitteldarm-Sporozoitien der jeweiligen Parasiten-Population aus den Moskitos präpariert und aus einer gleichen Anzahl ( $10^5$ ) Proteinextrakte hergestellt. Zum Vergleich wurden Proteinextrakte von Wildtyp-Parasiten parallel untersucht. Mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von TRAP (*repeat region*) konnte die Expression des Proteins in den TRAP-CTD-Varianten bestätigt werden (Abbildung 3.39), wobei für beide eine zu Wildtyp-Parasiten ähnliche Expression von TRAP detektiert werden konnte. Durch die als Ladekontrolle verwendete Detektion des CSP-Proteins (*circumsporozoite protein*) konnte deutlich gemacht werden, dass bei Wildtyp etwas weniger Proteinextrakt geladen wurde.

In beiden CTD-Mutanten erscheint TRAP bei einem etwas höheren Molekulargewicht verglichen mit dem Wildtyp-TRAP-Protein. Diese Beobachtung ist höchstwahrscheinlich auf die längere

zytoplasmatische Domäne von EBA175 (Abbildung 3.37) im Vergleich zu der entsprechenden Region von TRAP zurückzuführen.

**Abb.3.39: Expression der TRAP/EBA175-Varianten in Mitteldarm-Sporozoiten.**

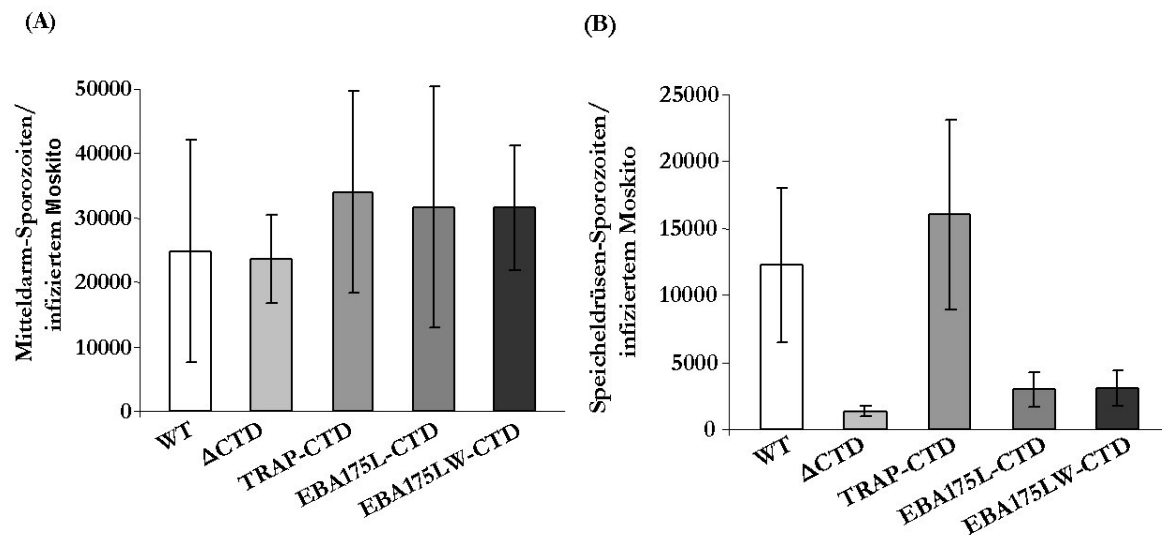
Proteinextrakte von jeweils  $10^5$  Mitteldarm-Sporozoiten der entsprechenden TRAP/EBA175-*swap*- und Wildtyp-Parasiten wurden auf einem 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt und durch Western-Blot analysiert. Die Detektion von TRAP und CSP erfolgte mit einem polyklonalen Antiserum gegen *Pb* TRAP (1:3000) bzw. einem monoklonalen Antikörper gegen *Pb* CSP (1:5000).



**3.5.2.1 Die EBA175-CTD-Mutanten zeigen ein deutlich reduziertes Invasionsverhalten in die Speicheldrüsen im Moskito-Vektor**

Um die Fähigkeit der EBA175-CTD-Mutanten das Mitteldarm-Epithelium bzw. die Speicheldrüsen zu invadieren, analysieren zu können, wurden aus mehreren Fütterungsexperimenten die Anzahl an Mitteldarm- und Speicheldrüsen-Sporozoiten bestimmt. Zum Vergleich mit den Sporozoiten-Zahlen für Wildtyp-Parasiten bzw. einer Positiv- und Negativ-Kontrolle (*Pf*TRAP-CTD und  $\Delta$ CTD) für die Komplementationsanalyse wurde auf die in Abbildung 3.22 und 3.23 gezeigten Daten zurückgegriffen.

Die Anzahl an Mitteldarm-Sporozoiten pro infiziertem Moskito ist, bei beiden EBA175-CTD-Mutanten, mit den Daten für Wildtyp-Parasiten bzw. mit beiden Kontrollen vergleichbar (Abbildung 3.40(A)). Diese Beobachtung wurde erwartet, da TRAP bei der Invasion des Mitteldarm-Epitheliums durch Ookineten keine essentielle Funktion ausübt. Im Gegensatz dazu ist die Infektion der Speicheldrüsen durch den Austausch der zytoplasmatischen Domäne von TRAP durch die von EBA175 stark beeinträchtigt (Abbildung 3.40(B)). Die Invasionsrate der EBA175L-CTD-*swap*-Mutante lag geringfügig über der der Negativ-Kontrolle, den  $\Delta$ CTD-Parasiten. Das Einführen des Tryptophan-Restes in die zytoplasmatische Domäne von EBA175 hatte keinen Einfluss auf die Invasion der *swap*-Parasiten in die Speicheldrüsen.



**Abb.3.40: Invasion der TRAP/EBA175-CTD-*swap*-Parasiten in das Mitteldarm-Epithelium und Speicheldrüsen im Mosquito-Vektor.** (A) Invasion der TRAP-CTD-Mutanten in das Mitteldarm-Epithelium im Mosquito-Vektor. Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von Mitteldarm-Sporozoiten pro infiziertem Mosquito. (B) Invasion der TRAP-CTD-Mutanten in die Speicheldrüsen des Mosquito-Vektors. Gezeigt sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von Speicheldrüsen-Sporozoiten pro infiziertem Mosquito. Die Daten aus (A) und (B) stammen aus mindestens 3 verschiedenen Fütterungsexperimenten. Die jeweiligen Sporozoiten-Zahlen für WT,  $\Delta$ CTD und TRAP-CTD wurden von den in Abschnitt 3.2.2.2 beschriebenen Ergebnissen übernommen. Abkürzungen: WT (Wildtyp).

### 3.5.2.2 *In vitro* und *in vivo* Invasion des Säugetier-Wirts durch die EBA175-CTD-*swap*-Mutanten

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die C-terminale Domäne des Blutstadien-Proteins EBA175 die Funktion der entsprechenden Region von TRAP im Hinblick auf die Invasion von Hepatozyten komplementieren kann. Dies wurde zunächst *in vitro* analysiert, indem isolierte Speicheldrüsen-Sporozoiten beider TRAP-CTD-Mutanten mit kultivierten Hepatozyten inkubiert und die Entwicklung zu exo-erythrozytären Formen (EEF) verfolgt wurde. Diese wurden nach geeigneter Antikörper-Färbung am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Für die *in vivo*-Analyse wurden die präparierten Speicheldrüsen-Sporozoiten ( $10^4$ ) intravenös in junge SD-Ratten injiziert und das Auftreten von Blutstadien-Parasiten durch Blutausschriebe kontrolliert. Wenn erythrozytäre Stadien nachgewiesen werden konnten, wurde diese einer genotypischen Analyse unterzogen.

Sowohl für die *in vitro*- als auch für die *in vivo*-Analyse wurde zum Vergleich mit Wildtyp-Parasiten auf die in Tabelle 3.2 gezeigten Daten zurückgegriffen. Dies trifft auch für die Negativ- und Positiv-Kontrolle für die Komplementationsanalyse zu. Zur besseren Übersicht wurden diese mit

denen für die TRAP-EBA175-CTD-*swap*-Parasiten ermittelten Daten in Tabelle 3.6 gegenüber gestellt. Hier wird ersichtlich, dass die zytoplasmatische Domäne von EBA175 die entsprechende Region von TRAP funktionell nicht ersetzen kann. Beide EBA175-CTD-Varianten zeigen ein Invasionsverhalten, das mit der Negativ-Kontrolle ( $\Delta$ CTD-Parasiten) vergleichbar ist. Diese mutierten Parasiten sind nicht fähig, Leberzellen *in vitro* zu infizieren. Dieser Befund wird durch die *in vivo*-Daten bestätigt. Allerdings konnten nach der Injektion von Speicheldrüsen-Sporozoitien der EBA175L-CTD-Mutante bei einem Tier erythrozytäre Stadien detektiert werden, die den rekombinanten, klonalen Genotyp aufwiesen (Tabelle 3.6). Jedoch konnte hier, im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten und auch der Positiv-Kontrolle, eine deutlich verzögerte Präpatenzzeit ermittelt werden, was auf eine geringere Infektivität der Parasiten schließen lässt. Eine seltene Blutstadien-Infektion korreliert mit den *in vitro*-Daten, denn dort konnten vereinzelt EEF-Formen detektiert werden. Auch bei der Injektion höherer Dosen an TRAP(-)-Sporozoitien, die einen nicht-invasiven und nicht-beweglichen Phänotypen zeigen, konnten erythrozytäre

**Tabelle 3.6: Infektion von Hepatozyten durch die TRAP/EBA175-CTD-Mutanten *in vitro* und *in vivo*.**

	Anzahl an Leberstadien <sup>a</sup> (EEF-Formen)	Blutstadien-positive Tiere/ Anzahl an infizierten Tieren	Präpatenzzeit <sup>b</sup> (Tagen)
<b>WT</b>	259 ( $\pm$ 48)	6/6	3,5
<b><math>\Delta</math>CTD</b>	0,9 ( $\pm$ 0,7)	0/6 <sup>c</sup>	-
<b><i>Pf</i>TRAP-CTD</b>	229 ( $\pm$ 75)	8/8 <sup>d</sup>	4,3
<b><i>Pf</i>EBA175L-CTD</b>	0,2 ( $\pm$ 0,4)	1/10 <sup>e</sup>	6,5
<b><i>Pf</i>EBA175LW-CTD</b>	0	0/8 <sup>c</sup>	-

<sup>a</sup> Speicheldrüsen-Sporozoitien ( $10^4$ ) wurden mit Hepatoma-Zellen (Huh7) inkubiert (42 Stunden). Die Anzahl an reifen Leberstadien (EEF-Formen) wurde nach entsprechender Färbung ermittelt. Dazu wurde der Anti-HSP70 Antikörper bzw. ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der gezählten EEF-Formen aus mindestens drei unabhängigen Fütterungsexperimenten bzw. aus Mehrfachbestimmungen pro Experiment. <sup>b</sup> Die Präpatenzzeit ist definiert als die Zeit, nach der die ersten Blutstadien-Parasiten nach der Injektion von  $10^4$  Speicheldrüsen-Sporozoitien detektiert werden konnten. <sup>c</sup> Bei einem Tier wurde eine Blutstadien-Infektion detektiert. Durch die genotypische Analyse konnte eine vollständige Reversion zum Wildtyp-TRAP-Gen-Lokus bestätigt werden. <sup>d</sup> Für eines der Blutstadien-positiven Tiere konnte eine gemischte Parasiten-Population, aus klonaler *Pf*TRAP-CTD-Population und Wildtyp, nachgewiesen werden. <sup>e</sup> Bei einem Tier wurden erythrozytäre Stadien detektiert. Durch die genotypische Analyse konnte der klonale rekombinante Gen-Lokus nachgewiesen werden.

Die Daten für Wildtyp,  $\Delta$ CTD und *Pf*TRAP-CTD wurden aus Abschnitt 3.2.2.3 übernommen.

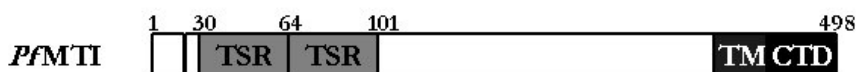


Stadien detektiert werden (*break-throughs*) (Sultan *et al.*, 1997). Das Durchkommen einiger weniger Parasiten scheint aber auf keinem aktiven Mechanismus zu beruhen, da unter anderem im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten bei der EBA175-CTD-Mutante eine deutlich verzögerte Präpatenzzeit vorliegt (Tabelle 3.6). Somit liegt in diesem Fall keine funktionelle Komplementation der zytoplasmatischen Domäne vor.

### 3.6 MTI-1: Ein weiteres TRAP-ähnliches Invasin?

Mit Hilfe von Sequenzanalysen in der *Plasmodium falciparum*-Genomdatenbank (Gardner *et al.*, 2002) mit der zweiten adhäsiven Domäne des TRAP-Proteins, dem TSR (*thrombospondin type I repeat*), konnte ein weiteres TRAP-ähnliches Protein identifiziert werden. Dieses wurde als MTI-1, für *merozoite TRAP-like invasin-1*, bezeichnet. Das Protein besitzt extrazellulär zwei hintereinander liegende TSR-Motive, eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Region (Abbildung 3.41(A)). Mit Hilfe eines Aminosäurevergleichs der C-terminalen Domänen von MTI-1 mit Proteinen der TRAP-Familie wurde deutlich, dass hier die charakteristischen Merkmale dieser Protein-Familie bezüglich dieser Region vorhanden sind (Abbildung 3.41(B)). Sowohl das konservierte Tryptophan als auch die Anhäufung negativ geladener Aminosäuren sind zu finden. Allerdings ist der Tryptophan-Rest nicht an vorletzter Position wie im Falle von TRAP und CTRP, sondern um zwei Positionen in Richtung N-terminal verschoben. Hier besteht eine Ähnlichkeit zu MIC2 von *T. gondii*, einem weiteren Mitglied der TRAP-Familie, bei dem dieser konservierte Aminosäure-Rest an drittletzter Position zu finden ist. Als weiteres charakteristisches Merkmal dieser Proteindomäne ist das Tyrosin konserviert. Die bei Proteinen der TRAP-Familie vorhandene extrazelluläre A-Domäne ist bei MTI-1 nicht zu finden.

(A)



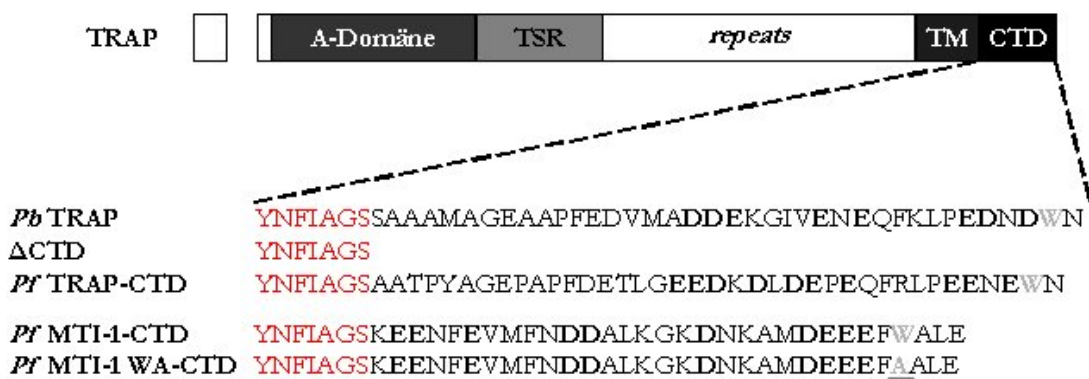
(B)

**CTD**

**PfMTI** YFLRKEKTEKVVQEEETKEENFEVMFNDDALKGKDNKAMDEEEFWALE  
**PfTRAP** YKFVVPGAATPYAGEPAPFDETLGEEEDKDLDEPEQFRLPEENEWN  
**Pb TRAP** YNFIAGSSAAAMAGEAAPFEDVMADDEKGVENEQFKLPEDNDWN  
**PfCTR** YNTLNGGEPHSSNMEFENVENNSGTEEEENEDFEVVDADDPMWN  
**Tg MIC2** YHYLSSSVGSPSAEIEYEADDGATKVVMEEEKETLVPVDDDDSDMWME

**Abb.3.41: Darstellung der Proteinstruktur von *P. falciparum* MTI-1 und der zytoplasmatischen Domäne.** (A) Schematische Darstellung der Primärstruktur von *Pf*MTI-1. Gezeigt sind die in der extrazellulären Domäne vorkommenden TSRs (*thrombospondin type I repeat*), die Transmembrandomäne (TM) und die zytoplasmatische Domäne (CTD; *cytoplasmic tail domain*). (B) Vergleich der Aminosäure-Sequenz der C-terminalen Domänen von MTI-1 mit Proteinen der TRAP-Familie; *Pf*TRAP, *Pb* TRAP, *Pf* CTRP und *Tg* MIC2. Die charakteristischen Merkmale, die auch bei MTI-1 zu finden sind, wurden hervorgehoben: Sowohl das konservierte Tyrosin als auch das Tryptophan sind in schwarz bzw. die negativ geladenen Reste in grau dargestellt. Abkürzungen: TSR (*thrombospondin type I repeat*); TM (Transmembrandomäne); CTD (*cytoplasmic tail domain*); MTI-1 (*merozoite TRAP-like invasin-1*); TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*); CTRP (*circumsporozoite- and TRAP-related protein*); *Tg* MIC2 (*T. gondii micronemal protein 2*).

Aufgrund der in den intrazellulären Domänen von MTI-1, und Proteinen der TRAP-Familie vorkommenden gemeinsamen Sequenz-Merkmale stellte sich die Frage, ob eine, mit TLP1 vergleichbare, Fähigkeit zur Komplementation der Domänen vorliegt. Um dies zu analysieren, wurden zwei Varianten der C-terminalen Domäne von MTI-1 für die Komplementations-Analyse an TRAP fusioniert (Abbildung 3.42). Diese umfassten zum einen die gesamte zytoplasmatische Domäne von MTI-1 und zum anderen eine im Tryptophan-Rest mutierte Version. Bei letzterer wurde der Tryptophan-Rest durch einen Alanin-Rest ausgetauscht (Abbildung 3.42). Mit dieser Mutation sollte untersucht werden, ob das Tryptophan eine essentielle Rolle bei der Funktion der intrazellulären Domäne von MTI-1 übernimmt. Wie auch bei den Analysen der EBA175-CTD-Mutanten wurden die Daten der Wildtyp-Parasiten, der Negativ-Kontrolle ( $\Delta$ CTD-Parasiten) und der Positiv-Kontrolle (*Pf*TRAP-CTD-Parasiten) aus Abschnitt 3.2 übernommen.



**Abb.3.42: Darstellung der MTI-1-CTD-Komplementations-Experimente.** Hervorgehoben ist die Sequenz der C-terminalen Domäne (CTD) von *P. berghei* TRAP; die verwendete Negativ-Kontrolle  $\Delta$ CTD; die Positiv-Kontrolle *Pf*TRAP-CTD und die beiden *Pf*MTI-1-CTD-Varianten. Bei *Pf*MTI-1-CTD wurde die gesamte zytoplasmatische Domäne von *Pf*MTI-1 an TRAP- $\Delta$ CTD fusioniert. Der C-terminale Bereich von *Pf*MTI-1 WA-CTD enthält eine Punktmutation, bei der das Tryptophan gegen Alanin ausgetauscht wurde (grau/unterstrichen). Die in den zytoplasmatischen Domänen vorkommenden negativ geladenen Aminosäuren sind in schwarz bzw. das bei Proteinen der TRAP-Familie konservierte und auch bei MTI-1 vorkommende Tryptophan in grau hervorgehoben. Abkürzungen: TSR (*thrombospondin type I repeat*); TM (Transmembrandomäne); CTD (*cytoplasmic tail domain*); TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*); MTI-1 (*merozoite TRAP-like invasin-1*).

### 3.6.1 Herstellung der *P. berghei* TRAP/MTI-1-CTD-*swap*-Parasiten

#### 3.6.1.1 Konstruktion der Transfektionsvektoren für die TRAP/MTI-1-CTD-Komplementationen

Die durch PCR-Amplifikation gewonnenen Fragmente der intrazellulären Domäne von *Pf*MTI-1 wurden mit *Bam*HI und *Xba*I geschnitten und nach Aufreinigung in den Integrations-Vektor pKH01 (3.2.1.1) kloniert. Dabei wurde die Punktmutation durch mutagenisierende PCR eingeführt. Daraus konnten die Plasmide NZ032/*Pf*MTI-1-CTD und pBE1702/*Pf*MIT-1 WA-CTD gewonnen werden (Thomas M. Daly und Lawrence W. Bergman, Philadelphia, USA).

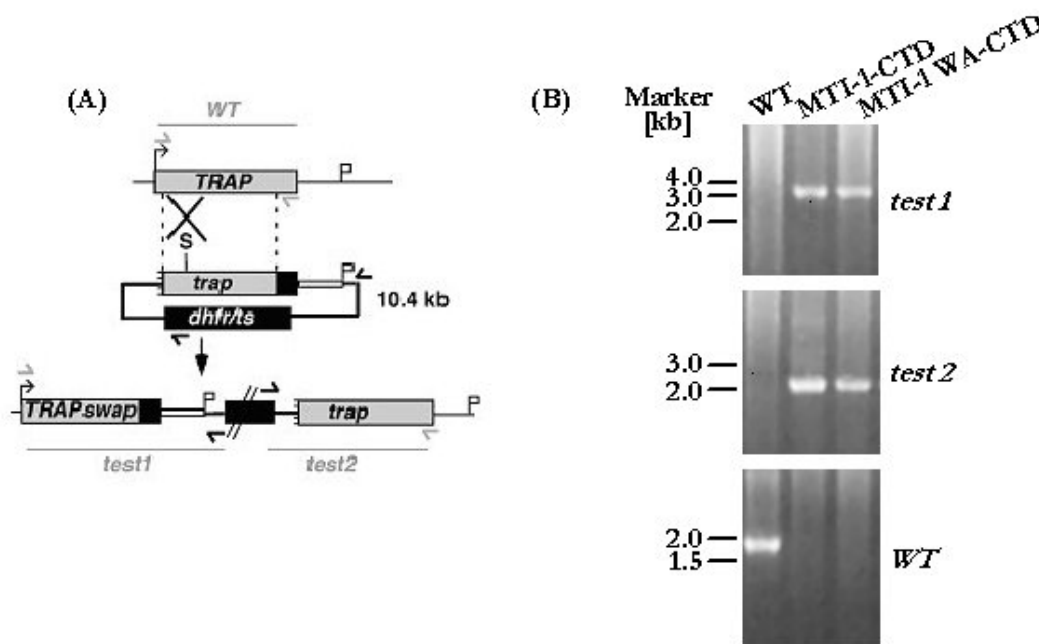
#### 3.6.1.2 Gewinnung und Genotypisierung der TRAP/MTI-1-CTD-*swap*-Parasiten

Die mit Hilfe des *P. berghei*-Transfektionssystems bzw. der CTD-*swap*-Integrations-Strategie (Abbildung 3.18) gewonnenen MTI-1-*swap*-Parasiten wurden für die Selektion klonaler Populationen verwendet.

Die genotypische Analyse jeweils einer der erhaltenen Klone ist in Abbildung 3.43 dargestellt. Sie basiert auf der in Abbildung 3.20 erläuterten integrations-spezifischen PCR, durch die sowohl die Integration des Transfektionskonstruktes als auch Kontaminationen durch Wildtyp-Parasiten

nachgewiesen werden können. Zum besseren Vergleich der verwendeten Primerkombinationen sind diese nochmal in dem unter Abbildung 3.43(A) gezeigten Schema aufgeführt.

Die Abwesenheit eines Wildtyp-spezifischen PCR-Fragments (*WT*) belegte den klonalen Ursprung der rekombinanten MTI-1-CTD-*swap*-Parasiten (Abbildung 3.43(B)). Insgesamt konnten aus den beiden Klonierungen zwei klonale MTI-1-CTD- bzw. fünf klonale MTI-1 WA-CTD- Populationen gewonnen werden, die genotypisch identisch sind. Für die im Folgenden gezeigten Daten wurden die unter Abbildung 3.43 dargestellten klonalen Populationen verwendet.

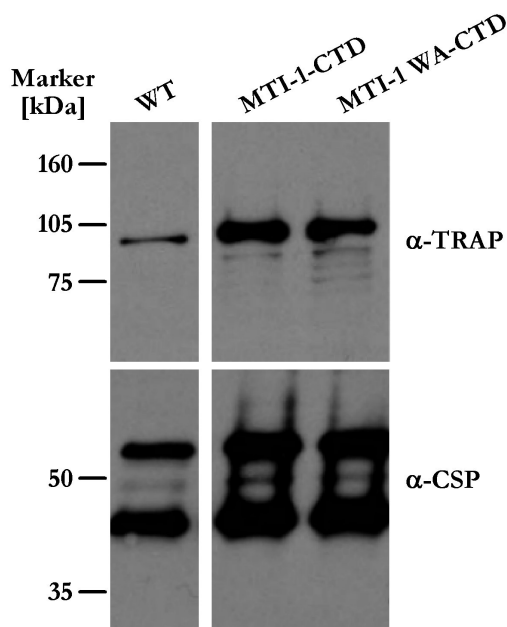


**Abb.3.43: Nachweis der klonalen TRAP/MTI-1-CTD-*swap*-Parasiten-Population mittels integrations-spezifischer PCR-Analyse.** (A) Allgemeine Integrations-Strategie der TRAP-CTD-*swaps* in das Genom von *P. berghei*. Die Pfeile symbolisieren die Oligonukleotidkombinationen zum Nachweis der Integration (*test 1* und *test 2*) und des Wildtyp *TRAP*-Gen-Lokus (*WT*) im rekombinanten bzw. im Wildtyp Gen-Lokus. Außerdem werden die möglichen Hybridisierungsstellen der verwendeten Primer im Wildtyp-Lokus, im Transfektionsplasmid und im rekombinanten Gen-Lokus gezeigt. Die Striche *test 1*, *test 2* und *WT* repräsentieren die amplifizierten PCR-Fragmente. (B) Integrations-spezifische PCR-Analyse mit den unter (A) gezeigten Primerkombinationen. Dargestellt ist jeweils eine klonale Population der TRAP/MTI-1-CTD-*swap*-Parasiten, die die erfolgreiche Integration des Transfektionskonstruktes am *TRAP*-Lokus aufweisen. Durch das Fehlen eines Wildtyp-spezifischen Signals konnte die klonale Population bestätigt werden. Abkürzungen: *WT* (Wildtyp); *S* (*SpeI*-Schnittstelle).

### 3.6.2 Phänotypische Analyse der *P. berghei* TRAP/MTI-1-CTD-*swap*-Parasiten

Wie schon für die vorherigen TRAP-CTD-*swap*-Parasiten beschrieben, hatte der Austausch der zytoplasmatischen Domäne von TRAP keinen Einfluss auf die Übertragung der klonalen *swap*-

Parasiten-Population auf Moskitos (Daten nicht gezeigt). Bevor untersucht werden konnte, ob die jeweilige Modifikation des TRAP-Proteins die Fähigkeit dieser Parasiten ihre Zielzellen zu penetrieren beeinflusst, musste die korrekte Expression der chimären Proteine bestätigt werden. Dazu wurden aus, mit der entsprechenden klonalen CTD-*swap*-Population und Wildtyp-Parasiten infizierten, Moskitos Mitteldarm-Sporozoiten isoliert. Die daraus hergestellten Proteinextrakte wurden für die folgende Western-Blot-Analyse verwendet. Hierbei konnte eine mit Wildtyp-Parasiten vergleichbare Expression des TRAP-Proteins in den jeweiligen CTD-*swap*-Parasiten detektiert werden (Abbildung 3.44). Mit der als Ladekontrolle dienenden Detektion des CSP-Proteins konnte gezeigt werden, dass geringfügig weniger Proteinextrakt von Wildtyp-Parasiten geladen wurde. Damit lässt sich die etwas schwächer erscheinende Expression des TRAP-Proteins bei Wildtyp-Parasiten erklären.



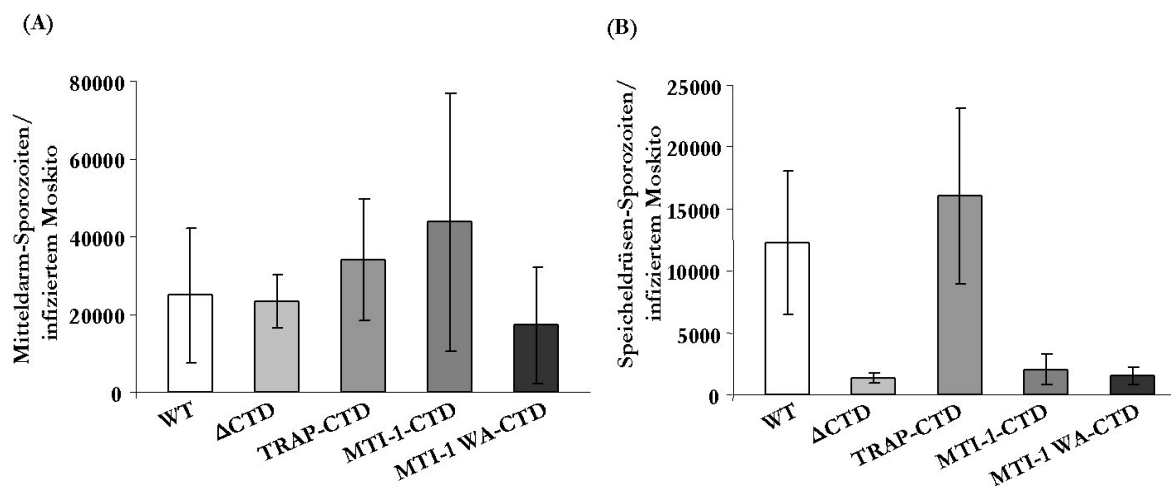
**Abb.3.44: Protein-Expression der TRAP/MTI-1-CTD-Varianten in Mitteldarm-Sporozoiten.**

Proteinextrakte von  $10^5$  Sporozoiten der jeweiligen TRAP-CTD-Mutanten und Wildtyp wurden auf einem 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt und für die Western-Blot-Analyse auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das TRAP-Protein wurde mit einem polyklonalen Antiserum gegen *Pb* TRAP bzw. das *Pb* CSP-Protein mit einem monoklonalen Antikörper detektiert.

### 3.6.2.1 Die TRAP/MTI-1-CTD-Mutanten zeigen ein mit den TRAP/EBA175-CTD-Mutanten vergleichbares Invasionsverhalten in die Speicheldrüsen von *An. stephensi*

Die aus verschiedenen Fütterungsexperimenten bestimmten Sporozoiten-Zahlen für die TRAP/MTI-1-CTD-Mutanten sind in Abbildung 3.45 dargestellt. Durch diese Zahlen lässt sich eine Aussage darüber machen, ob diese Parasiten-Populationen fähig sind, ihre Zielzellen erfolgreich zu infizieren. Im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten und den für die Komplementation analysierten Kontrollen ( $\Delta$ CTD- und TRAP-CTD-Parasiten; Abschnitt 3.2.2.2) konnte kein Einfluss der TRAP-Modifikation auf die Invasion des Mitteldarm-Epitheliums belegt werden

(Abbildung 3.45(A)). Dem gegenüber steht die erheblich reduzierte Anzahl an Speicheldrüsen-Sporozoitien bei beiden MTI-1-CTD-Mutanten (Abbildung 3.45(B)), die nicht viel über der Negativ-Kontrolle ( $\Delta$ CTD-Parasiten) liegt. Dieser Invasions-Phänotyp lässt sich mit dem der EBA175-CTD-Mutanten in Abbildung 3.40(B) vergleichen. Das Vorhandensein des Tryptophan-Restes in der C-terminalen Domäne von MTI-1 scheint hier keine Rolle zu spielen, da kein merklicher Unterschied zwischen den beiden *tail*-Varianten erkennbar ist (Abbildung 3.45(B)).



**Abb.3.45: Sporozoitien-Zahlen der TRAP/MTI-1-CTD-*swap*-Parasiten aus dem Mitteldarm und der Speicheldrüse von *An. stephensi*.** (A) Anzahl an Mitteldarm-Sporozoitien der TRAP-CTD-Mutanten. Gezeigt sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von Mitteldarm-Sporozoitien pro infiziertem Moskito. (B) Anzahl an Speicheldrüsen-Sporozoitien der TRAP-CTD-Mutanten. Gezeigt sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von Speicheldrüsen-Sporozoitien pro infiziertem Moskito. Die Daten aus (A) und (B) stammen aus mindestens 2 verschiedenen Fütterungsexperimenten. Die jeweiligen Sporozoitien-Zahlen für WT,  $\Delta$ CTD und TRAP-CTD wurden von den in Abschnitt 3.2.2.2 beschriebenen Ergebnissen übernommen. Abkürzungen: WT (Wildtyp).

### 3.6.2.2 Infektion von Hepatozyten durch die MTI-1-CTD-*swap*-Parasiten *in vitro* und *in vivo*

Die Fähigkeit der CTD-*swap*-Parasiten Hepatozyten zu invadieren und sich zu Leberstadien zu entwickeln wurde *in vitro* mit Hilfe kultivierter Hepatoma-Zellen untersucht. Dazu wurden Speicheldrüsen-Sporozoitien mit kultivierten Hepatozyten inkubiert, und die sich nach 42 Stunden differenzierten Leberstadien (exo-erythrozytäre Formen; EEF-Formen) nach geeigneter Antikörper-Färbung gezählt. Für die *in vivo*-Analyse wurden die Speicheldrüsen-Sporozoitien ( $10^4$ ) der jeweiligen CTD-*swap*-Parasiten intravenös in junge SD-Ratten injiziert. Das Auftreten von erythrozytären Stadien wurde durch Blutausschläge verfolgt.

Die in Tabelle 3.7 zusammengefassten Daten zeigen deutlich, dass die MTI-1-CTD-Mutanten ein mit der Negativ-Kontrolle ( $\Delta$ CTD-Parasiten) vergleichbares Verhalten *in vitro* zeigen. Es konnten keine Leberstadien detektiert werden. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für die EBA175-CTD-Mutanten gezeigt werden. Sporozoiten der TRAP-CTD-Mutante, die mit der Wildtyp-Version der zytoplasmatischen Domäne von MTI-1 ausgestattet waren, konnten keine Blutstadien-Infektion in den Tieren induzieren. Dies unterstützt die *in vitro* erhaltenen Daten. Allerdings konnten bei einem Tier, das mit Sporozoiten der MTI-1 WA-CTD-Mutante injiziert wurde, erythrozytäre Stadien nach einer Präpatenzzeit zwischen 6 und 7 Tagen detektiert werden. In Analogie zu den EBA175-*swap*-Experimenten kann davon ausgegangen werden, dass hier keine funktionelle Komplementation der CTD vorliegt.

**Tabelle 3.7: Invasionsverhalten der MTI-1-CTD-*swap*-Parasiten in Hepatozyten *in vitro* und *in vivo*.**

	Anzahl an Leberstadien <sup>a</sup> (EEF-Formen)	Blutstadien-positive Tiere/ Anzahl an infizierten Tieren	Präpatenzzeit <sup>b</sup> (Tagen)
<b>WT</b>	259 ( $\pm$ 48)	6/6	3,5
<b><math>\Delta</math>CTD</b>	0,9 ( $\pm$ 0,7)	0/6 <sup>c</sup>	-
<b><i>Pf</i>TRAP-CTD</b>	229 ( $\pm$ 75)	8/8 <sup>d</sup>	4,3
<b><i>Pf</i>MTI-1-CTD</b>	0,5 ( $\pm$ 0,9)	0/5 <sup>c</sup>	-
<b><i>Pf</i>MTI-1 WA-CTD</b>	0,1 ( $\pm$ 0,3)	1/4 <sup>e</sup>	6,5

<sup>a</sup> Für die Detektion von Leberstadien wurden Speicheldrüsen-Sporozoiten ( $10^4$ ) der jeweiligen TRAP-*swap*-Mutante mit Hepatoma-Zellen (Huh7) inkubiert (42 Stunden). Die Anzahl an sich entwickelten Leberstadien (EEF-Formen) wurde nach entsprechender Färbung ermittelt. Dazu wurde der Anti-HSP70 Antikörper bzw. ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter sekundäre Antikörper verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der gezählten EEF-Formen aus mindestens zwei unabhängigen

Fütterungsexperimenten bzw. aus Mehrfachbestimmungen pro Experiment. <sup>b</sup> Die Präpatenzzeit ist definiert als die Zeit, nach der die ersten Blutstadien-Parasiten nach der Injektion von  $10^4$  Speicheldrüsen-Sporozoiten detektiert werden konnten. <sup>c</sup> Bei einem Tier wurde eine Blutstadien-Infektion detektiert. Durch die genotypische Analyse konnte eine vollständige Reversion zum Wildtyp-TRAP-Gen-Lokus bestätigt werden. <sup>d</sup> Für eines der Blutstadien-positiven Tiere konnte eine gemischte Parasiten-Population, aus klonaler *Pf*TRAP-CTD-Population und Wildtyp, nachgewiesen werden. <sup>e</sup> Bei einem Tier wurden erythrozytäre Stadien nachgewiesen. Durch die genotypische Analyse konnte der klonale rekombinante Gen-Lokus nachgewiesen werden.

Die Daten für Wildtyp,  $\Delta$ CTD und *Pf*TRAP-CTD wurden aus Abschnitt 3.2.2.3 übernommen.

## 4. Diskussion

Ein entscheidender Schritt für die Verbreitung von Parasiten ist die schnelle und erfolgreiche Invasion der entsprechenden Wirtszellen. Die drei während des Lebenszyklus von *Plasmodium* vorkommenden invasiven Stadien, Ookineten, Sporozoiten und Merozoiten, müssen dabei in unterschiedlichste Zelltypen eindringen. Dies erfordert die spezifische Erkennung, Anheftung und die aktive Invasion der jeweiligen Zielzelle. In Ookineten- und Sporozoiten-Stadien konnten Proteine der, im Phylum *Apicomplexa* verbreiteten, TRAP-Familie als Invasine identifiziert werden (Sultan *et al.*, 1997; Dessens *et al.*, 1999; Templeton *et al.*, 2000). Proteine dieser Familie spielen desweiteren eine essentielle Funktion bei der Gleitbewegung des Parasiten. Das für das Eindringen in Erythrozyten verantwortliche Protein bzw. ein TRAP-Paralog in Blutstadien konnte bisher noch nicht beschrieben werden.

Das in dieser Arbeit identifizierte und charakterisierte *TRAP-like protein 1* (TLP1) besitzt die strukturellen Charakteristika von Proteinen der TRAP-Familie (Abbildung 3.4). Diese umfassen die extrazellulär vorkommenden adhäsiven Domänen, die von Willebrand A-Domäne und den *Thrombospondin type I repeat* (TSR), die Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne. In der C-terminalen Region von TLP1 ist dabei sowohl das bei Mitgliedern der TRAP-Familie konservierte Tryptophan als auch die Ansammlung negativ geladener Aminosäuren zu finden (Abbildung 3.4(D)). Diese Aminosäure-Reste sind für die Funktion des Sporozoiten-Invasins TRAP im Hinblick auf die Invasion und Bewegung des Parasiten essentiell (Kappe *et al.*, 1999). Basierend auf diesen strukturellen Gemeinsamkeiten in der intrazellulären Domäne wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Strategie (Abbildung 3.17) verwendet, mit der TLP1 funktionell als drittes *Plasmodium*-Mitglied der TRAP-Protein-Familie identifiziert werden konnte. Mit Hilfe reverser Genetik wurden *P. berghei*-Parasiten hergestellt, bei denen die zytoplasmatische Domäne (CTD) von TRAP durch die entsprechende Region von TLP1 ersetzt wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die CTD von TLP1 die Funktion der TRAP-CTD bei der Invasion der Speicheldrüsen im Moskito-Vektor und Hepatozyten im Säugetier-Wirt teilweise komplementieren kann (Abbildung 3.23; Tabelle 3.2). Dies konnte erstmals auch für die C-terminale Region des beschriebenen Mitglieds der TRAP-Protein-Familie, dem Ookineten-Invasin CTRP, belegt werden. Hier wurde eine funktionelle Komplementation der zytoplasmatischen Domäne von TRAP und damit die Zuweisung in diese Protein-Familie erwartet, da *CTRP(-)*-Parasiten das Mitteldarm-Epithelium nicht invadieren können und auch eine reduzierte Bewegung zeigen (Dessens *et al.*, 1999). Ein vergleichbarer Phänotyp ist bei *TRAP(-)*-Parasiten zu finden, die weder ihre Wirtszellen invadieren können, noch die für



Speicheldrüsen-Sporozoiten charakteristische Gleitbewegung zeigen (Sultan *et al.*, 1997). Die dabei für beide Prozesse, Invasion und Bewegung, essentielle Funktion der TRAP-CTD konnte durch die Deletion dieser Domäne in *P. berghei* nachgewiesen werden (Kappe *et al.*, 1999). Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Komplementation der TRAP-CTD-Domäne durch die entsprechende Region von TLP1 bzw. CTRP konnte jedoch eine im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten reduzierte Invasion der jeweiligen Wirtszellen ermittelt werden (Abbildung 3.23; Tabelle 3.2). Das chimäre Protein TRAP/CTRP-CTD wurde mit der zytoplasmatischen Domäne von *P. falciparum* hergestellt. Deshalb könnten hier eventuell auf Proteinebene-basierende Unterschiede in den beiden *Plasmodium*-Arten für das reduzierte Invasionsverhalten in Betracht gezogen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne des *T. gondii*-Tachyzoiten-Proteins MIC2 die entsprechende Region von *P. berghei*-TRAP in deren Funktionen ersetzen kann (Kappe *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Beobachtung kann höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden, dass diesbezügliche Unterschiede zwischen den *Plasmodium*-Arten bei dem detektierten reduzierten Invasionsverhalten eine Rolle spielen. Möglicherweise können stadien-spezifische, d.h. in Ookineten, Sporozoiten und Merozoiten vorliegende, Unterschiede involviert sein. So zeigen sowohl *Plasmodium*-Sporozoiten als auch *Toxoplasma*-Tachyzoiten kontinuierliche, schnelle Gleitbewegungen (1-10µm/Sekunde) (Kappe *et al.*, 2004b), während Ookineten um Größenordnungen (5µm/Minute) (Vlachou *et al.*, 2004) langsamer gleiten. Diese könnten in der molekularen Zusammensetzung der gesamten Motormaschinerie bzw. der mit der Maschinerie interagierenden Proteinen liegen. Denkbar wäre, dass für jedes invasive Stadium zusätzliche Proteine beteiligt sind, die durch die Veränderung der zytoplasmatischen Domäne nicht optimal interagieren können.

Eine aktive Invasion setzt ein Transmembranprotein voraus, das extrazellulär mit dem entsprechenden Rezeptor(en) und intrazellulär mit dem Aktin-Myosin-Motor interagiert. Für Invasine der TRAP-Familie konnte Aldolase als ein Verbindungsprotein zwischen der zytoplasmatischen Domäne der Oberflächenmoleküle und Aktin beschrieben werden (Jewett und Sibley, 2003; Buscaglia *et al.*, 2003). Obwohl die genaue Rolle dieses Enzyms bei diesem Prozess noch unklar ist, ist die Bindung des Proteins an die CTD von Proteinen der TRAP-Familie *in vitro* charakteristisch und steht in Verbindung mit Invasion und Bewegung des Parasiten. Die in diesem Zusammenhang bestätigte Bindung von Aldolase an die C-terminale Region von TLP1 (Abbildung 3.26) liefert einen zu der Komplementationsanalyse unabhängigen Beweis, für die funktionelle Homologie der Domänen. Diesbezüglich würde erwartet werden, dass durch die Mutation des konservierten Tryptophans bzw. der negativ geladenen Aminosäuren eine zu TRAP (Abbildung 3.26) analoge Reduktion in der Bindung von Aldolase an die zytoplasmatische

Domäne von TLP1 beobachtet werden kann. Deshalb wäre es in weiteren Experimenten interessant, die Bindungseigenschaften von Aldolase an die zytoplasmatische Domäne von TLP1 durch solche Punktmutationen zu analysieren. Das allerdings die Bindung von Aldolase an die CTD von TLP1 *in vivo* eine Rolle spielt, wird dadurch bestätigt, dass die CTD von TLP1 die entsprechende Region von TRAP partiell in ihrer Funktion in Sporozoiten komplementieren kann.

Dem gegenüber steht, dass die Bindung von Aldolase an die Carboxy-terminale Domäne von TLP1 durch direkte Interaktionsanalysen in Hefe nicht bestätigt werden konnte (Tabelle 3.3). Ein methodischer Fehler konnte dabei insofern ausgeschlossen werden, als dass die von Bergman (Bergman *et al.*, 2003) identifizierte Interaktion der MyosinA-*tail* Domäne und MTIP (*myosinA tail domain interacting protein*) belegt werden konnte (Tabelle 3.3). Bei dem glykolytischen Enzym Aldolase handelt es sich um ein oligomeres Protein. Ungeklärt bleibt, in wie weit die Tetramerbildung in dem verwendeten *yeast-two-hybrid*-System gewährleistet wird. Ist die Tetramerstruktur der Aldolase Voraussetzung für eine Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von TLP1, so ist womöglich die Wechselwirkung mit dem Monomer zu schwach um detektiert werden zu können. Diesbezüglich wäre außerdem vorstellbar, dass ein tetrameres Aldolasemolekül *in vivo* mit mehreren CTD, d.h. mit beispielsweise zwei oder vier TRAP- oder TLP1-Molekülen, interagiert und dadurch ein Komplex gebildet wird. Auszuschließen ist eben so wenig, dass im Hefesystem eine Konkurrenz mit dem Substrat für die enzymatische Aktivität der Aldolase vorliegt. Mit Hilfe von Inhibitionsanalysen, durch die die Bindestelle von TRAP im Aldolase-Protein erfasst werden sollte, konnte gezeigt werden, dass sowohl durch das Substrat als auch durch Produkte des Enzyms die Bindung von Aldolase an TRAP-CTD inhibiert wird (Buscaglia *et al.*, 2003). Die Autoren postulierten, dass TRAP entweder direkt am aktiven Zentrum oder einer anderen Region, die durch eine Konformationsänderung infolge der Bindung des Substrates am aktiven Zentrum verdeckt wird, bindet.

In weiteren Interaktionsanalysen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte die beschriebene Bindung der Aldolase an Aktin (Schindler *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1997) nicht detektiert werden. Auch hierfür könnte die Tetramerstruktur des Enzyms verantwortlich sein. Zwar ist beschrieben, dass jedes Monomer eine Bindestelle für Aktin aufweist (Wang *et al.*, 1997), jedoch könnte die Interaktion (in *Plasmodium*) filamentöses Aktin voraussetzen und die Bindung an globulär vorliegendes Aktin nicht, oder nur schwach stattfinden. In *in vitro*-Untersuchungen der Interaktion von *P. falciparum*-Aldolase mit F-Aktin konnte gezeigt werden, dass Aldolase mit Aktinmikrofilamenten ko-präzipitiert werden kann (Buscaglia *et al.*, 2003) und das diese

Interaktion durch das Aldolase-Substrat teilweise inhibiert wird. Somit kann hier eine Inhibition durch das Substrat des Enzyms auch nicht ausgeschlossen werden.

Eine interessante Beobachtung bei der Analyse der CTD-Komplementationen konnte bezüglich des *gliding motility*-Phänotyps gemacht werden (Abbildung 3.25). Basierend auf der Arbeit von Kappe *et al.* (Kappe *et al.*, 1999) wurde davon ausgegangen, dass die zytoplasmatische Domäne von *Pf*TRAP die entsprechende Region von *Pb*TRAP auch hinsichtlich der Gleitbewegung des Parasiten komplementieren kann. Allerdings zeigten diese Parasiten einen reduzierten *gliding motility*-Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten (Abbildung 3.25). Hierbei ist nochmal zu erwähnen, dass diese Parasiten ein normales Invasionsverhalten in ihre Zielzellen zeigten (Abbildung 3.23; Tabelle 3.2). Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass die charakteristische Gleitbewegung der Sporozoiten und das Eindringen in die Wirtszelle mechanistisch verwandt sind. Beide Funktionen werden unter anderem durch den Aktin-Myosin-Motor des Parasiten (Dobrowolski und Sibley, 1996; Meissner *et al.*, 2002) und das Transmembranprotein TRAP (Sultan *et al.*, 1997) vermittelt. Jedoch weisen neuere Daten darauf hin, dass *gliding motility* für die Invasion von Sporozoiten in Wirtszellen nicht unbedingt notwendig ist (nicht publizierte Daten, Ahmed Aly). Invasion und *gliding motility* können genetisch getrennt werden und dies lässt auf ein Zusammenspiel für beide Prozesse spezifischer Proteine schließen. Worauf allerdings die hier detektierte reduzierte Bewegung der *Pf*TRAP-CTD-Parasiten basiert, sollte genauer untersucht werden. Denn dieser Beobachtung stehen erneut die sich mit Wildtyp-Parasiten vergleichbar bewegenden TRAP-*Tg*MIC2-CTD-Parasiten (Kappe *et al.*, 1999) gegenüber.

Für TRAP-CTRP-CTD- und TRAP-TLP1-CTD-Sporozoiten konnte ein *gliding motility*-Phänotyp nachgewiesen werden, der am ehesten mit Mitteldarm-Sporozoiten ( $\leq 10\%$ ) vergleichbar ist (Sultan *et al.*, 1997) (Abbildung 3.25). Für Ookineten sind verschiedene Formen der Bewegung wie z. B. stationäre Rotation und eine spiral-förmig verlaufende Fortbewegung beschrieben (Vlachou *et al.*, 2004). Ob eine Korrelation zwischen der Art der Bewegung und der nicht detektierten Komplementation der CTD von TRAP durch die CTRP-CTD bezüglich der *gliding motility* vorliegt, bleibt zu untersuchen. Außerdem ist wahrscheinlich zu beachten, dass sich Ookineten (5 $\mu$ m/Minute) (Vlachou *et al.*, 2004) im Vergleich zu Speicheldrüsen-Sporozoiten (1-10 $\mu$ m/Sekunde) (Kappe *et al.*, 2004b) deutlich langsamer bewegen. Eine auf substrat-basierende Bewegung ist für Merozoiten nicht bekannt. Allerdings erfordert die Re-Orientierung des apikalen Pols an der Oberfläche des Erythrozyten nach der initialen Adhäsion und die Invasion eine aktive Bewegungsform. Der molekulare Mechanismus dieser Re-Orientierung ist noch nicht aufgeklärt. Nähere Einblicke in diesen Prozess konnten in einer neueren Studie gegeben werden,

in der AMA1 eine mögliche Funktion bei diesem Prozess zugeteilt wurde (Mitchell *et al.*, 2004). Hier konnten in Anwesenheit eines Antikörpers gegen AMA1 die Merozoiten zwar normal an die Erythrozytenoberfläche adhären, jedoch nicht (apikal) re-orientieren. Basierend darauf folgerten die Autoren, das AMA1 entweder in der Re-Orientierung des Parasiten oder in der Bildung der *tight junction* involviert ist. Fraglich bleibt jedoch, in wie weit durch AMA1 eine Verbindung mit dem Aktin-Myosin-Motor gewährleistet wird, die für diese Bewegung sicherlich notwendig ist.

Wahrscheinlich deuten die in dieser Arbeit erhaltenen, unterschiedlichen *gliding motility*-Phänotypen darauf hin, dass für die verschiedenen Bewegungsformen in den invasiven Stadien spezifische Moleküle erforderlich sind.

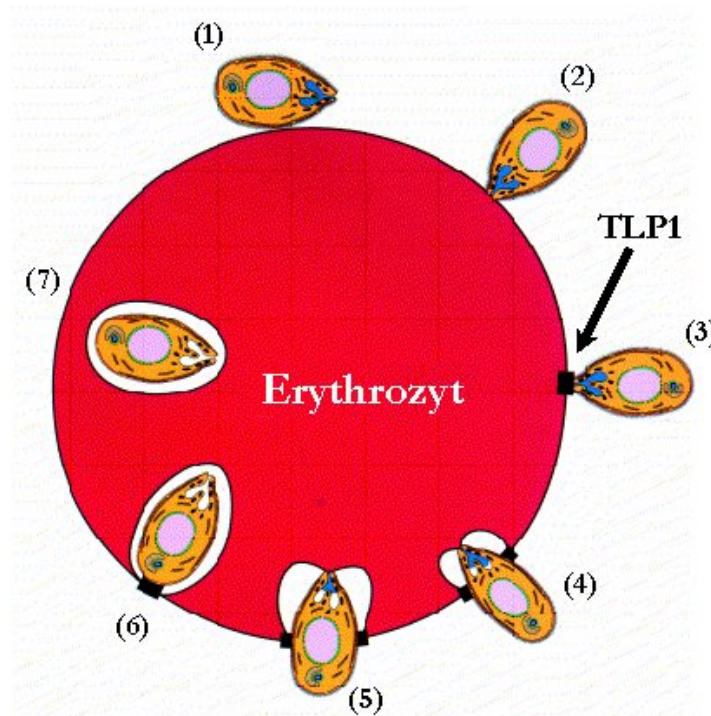
Für Merozoiten konnte bislang kein Protein identifiziert werden, das das Kriterium als „Verbindungsprotein“ eines extrazellulär stattfindenden (Rezeptor-)Erkennungsprozesses mit dem intrazellulären Motor erfüllen könnte. *TRAP-like protein 1* könnte eine solche Funktion übernehmen, denn es besitzt die dafür erforderlichen adhäsiven Domänen und die Fähigkeit, über die zytoplasmatische Domäne mit dem Aktin-Myosin-Motor zu interagieren. Proteine der TRAP-Familie spielen eine zentrale Rolle bei der Wirtszellinvasion und der Bewegung der Parasiten, wodurch sie in ihrer Funktion essentiell für den Parasiten sind. Dies scheint auch für TLP1 zu zutreffen, denn in mehreren Versuchen konnte das Gen nicht deletiert werden (Abbildung 3.35 und 3.36). In weiterführenden Experimenten, in denen die *Replacement*-Strategie zur Inaktivierung des *TLP1*-Gens eingesetzt werden soll, könnte die essentielle Funktion von TLP1 in Blutstadien untermauert werden. Hierbei wird der endogenen *TLP1*-Gen-Lokus vollständig durch den Selektionsmarker ersetzt und somit inaktiviert.

Der direkte Beweis, das TLP1 an der Invasion der Erythrozyten beteiligt ist, erfordert die Analyse eines konditionalen/induzierbaren *TLP1*-Allels, wodurch gewährleistet wird, dass die Inaktivierung von TLP1 schnell und direkt vor der Freilassung der in der Leber differenzierten Merozoiten stattfindet. Dazu ist es kürzlich gelungen, Ansätze für die konditionale Mutagenese in *Plasmodium* zu etablieren, die einerseits auf der orts-spezifischen Rekombination durch die Flp-Rekombinase (aus Hefe) basieren (Carvalho *et al.*, 2004). Durch stadien-spezifische Promotoren wird die Expression der Rekombinase in *P. berghei* kontrolliert und gewährleistet dadurch die funktionelle Analyse eines beliebigen Proteins *in vivo* (in den haploiden Stadien des Parasiten). Andererseits konnte mit dem Tetracyclin-induzierbaren System, durch das in *T. gondii* ein konditionaler Knock-out eines essentiellen Gens generiert werden konnte (Meissner *et al.*, 2002), die induzierbare und stadien-spezifische Expression zweier Reportergene in *Plasmodium falciparum*

erreicht werden (Meissner *et al.*, 2005). Trotz dieser Fortschritte bezüglich der konditionalen Mutagenese in *Plasmodium* konnte mit keinem Ansatz ein, während des erythrozytären Zyklus, essentielles Gen erfolgreich herunter reguliert werden. Alternativ könnte in Betracht gezogen werden, die bei TLP1 extrazellulär vorkommenden adhäsiven Domänen selektiv zu mutieren. Durch spezifisch eingeführte Punktmutationen könnte die Interaktion mit dem entsprechenden Ligand(en) auf der Oberfläche von Erythrozyten abgeschwächt oder gar aufgehoben werden. Mit Hilfe dieser Strategie konnte belegt werden, dass bei TRAP beide extrazellulären Bindedomänen (von Willebrand A-domäne und TSR) bei der Wirtszellinvasion eine funktionelle Rolle spielen (Matuschewski *et al.*, 2002b). Jedoch würde eine solche Modifikation im Falle von TLP1 das Wachstum der Blutstadien-Parasiten beeinträchtigen und damit eine Isolierung der betreffenden mutierten Parasiten-Populationen erschweren.

Die Korrelation von TLP1 mit der Invasion der Merozoiten in rote Blutkörperchen erweitert diesen komplizierten Prozess um ein weiteres Molekül. Dieser, in vielen Schritten ablaufende, Prozess ist von einer Kaskade spezifischer Interaktionen abhängig (Gaur *et al.*, 2004). Obwohl viele Proteine bekannt sind, die bei der Invasion eine wichtige Rolle spielen, sind deren funktionelle Charakteristika noch weitgehend unbekannt. Die mögliche Funktion des *TRAP-like protein1* wird in dem in Abbildung 4.1 dargestellten Arbeitsmodell beschrieben. Nach der ersten Anlagerung des Merozoiten an der Oberfläche des Erythrozyten und der Re-Orientierung wird die *tight junction* ausgebildet. TLP1 könnte bei der Ausbildung dieser festen, irreversiblen Bindung beteiligt sein (Abbildung 4.1(3)). In Anbetracht der für TLP1 nachgewiesenen Fähigkeit, Aldolase zu binden (Abbildung 3.26) und damit eine extrazellulär stattfindende Interaktion mit dem intrazellulären Aktin-Myosin-Motor zu verbinden, könnte TLP1 auch in die Rückwärtsbewegung der *junction* involviert sein (Abbildung 4.1(4-5)). Eine interessante Beobachtung wäre, TLP1 an der *moving junction* von eindringenden Merozoiten zu lokalisieren. Allerdings sind diese, auf Elektronenmikroskopie basierende, Studien sehr schwer durchführbar und erfordern hochspezifische Antikörper.

Bewegung und Invasion von Parasiten des Phylums *Apicomplexa* werden durch Proteine der TRAP-Familie vermittelt. Die Translokation dieser Oberflächenproteine, die extrazellulär mit dem Substrat/Rezeptor und intrazellulär mit der Motormaschinerie interagieren, zum posterioren Ende resultiert in der Vorwärts-Bewegung und der Invasion der Parasiten (Kappe *et al.*, 2004a und b; Soldati *et al.*, 2004). Somit wäre die für TLP1 postulierte Funktion in der Rückwärtsbewegung der *junction* bzw. der durch Translokation des Proteins mögliche Invasion, in Analogie zu der Funktion von Proteinen der TRAP-Familie.



**Abb.4.1: Arbeitsmodell für die mögliche Funktion von TLP1 bei der Invasion von Erythrozyten.**

Dargestellt sind die wichtigsten Schritte bei der Invasion. (1) Reversible Bindung des Merozoiten an der Erythrozytenmembran. (2) Re-Orientierung des Merozoiten. (3) Irreversible Bindung an den Erythrozyten und damit begleitend die Ausbildung der *tight junction*. (4-5) Invasion; die *junction* wird dabei, vom apikalen Ende ausgehend, beidseitig über die Merozoitenoberfläche nach hinten bewegt (*moving junction*). Der Parasit bewegt sich in eine Einstülpung der Wirtszellmembran, in die sich bildende parasitophore Vakuole. (6-7) Aufhebung der *junction* und Fusion der Erythrozytenmembran. Der Pfeil symbolisiert, bei welchem Schritt der Invasion TLP1 beteiligt sein könnte. Abkürzungen: TLP1 (*TRAP-like protein 1*). Abbildung modifiziert nach Cowman *et al.*, 2000.

Auch das kürzlich beschriebene Merozoitenprotein *Plasmodium thrombospondin-related apical merozoite protein* (PTRAMP) könnte eine, bis jetzt noch undefinierte, Rolle bei der Invasion spielen (Thompson *et al.*, 2004). PTRAMP besitzt in der extrazellulären Domäne ein TSR-Motiv, jedoch keine von Willebrand A-Domäne. Die zytoplasmatische Domäne von TRAMP weist keine der charakteristischen Sequenzmerkmale der entsprechenden Domänen von Proteinen der TRAP-Familie auf. Obwohl negativ geladene Aminosäuren vorkommen, fehlt das konservierte Tryptophan, das, unter anderem für die Bindung von Aldolase essentiell ist (Jewett und Sibley, 2003; Buscaglia *et al.*, 2003). Versuche das PTRAMP-Gen auszuschalten waren nicht erfolgreich, was eine essentielle Funktion des Proteins während der Blutstadien-Entwicklung (und/oder Invasion) vermuten lässt (Thompson *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit konnte ein weiteres Protein identifiziert werden, das in der extrazellulären Domäne ebenfalls TSRs besitzt. Bei diesem, als *merozoite TRAP-like invasin-1* (MTI-1) bezeichneten Protein, sind zwei TSR-Motive hintereinander angeordnet (Abbildung 3.41). In der zytoplasmatischen Domäne von MTI-1 sind Anhäufungen von negativ geladenen Aminosäuren und auch das C-terminale Tryptophan zu finden (Abbildung 3.41). Durch die CTD-Komplementations-Analyse wurde allerdings deutlich, dass dieses Protein funktionell nicht in die Familie der TRAP-Invasine eingeordnet werden kann (Abbildung 3.45 und Tabelle 3.7). Die intrazelluläre Domäne von MTI-1 konnte die TRAP-CTD-Funktionen hinsichtlich der Invasion der Wirtszellen nicht ersetzen. Unter Berücksichtigung der vorliegenden strukturellen Gemeinsamkeiten der C-terminalen Domänen von TRAP und MTI-1 (Abbildung 3.41) wäre eine Komplementation vorstellbar gewesen. In wie weit eventuell die Länge der Domäne oder aber der, im Vergleich zu TRAP und CTRP um zwei Positionen verschobene, Tryptophan-Rest eine Rolle spielt, muss in weiteren Experimenten analysiert werden. Aufschluss darüber könnten durch Punktmutation eingeführte Modifikationen der Domäne geben, durch die z.B. die Position des Tryptophans verändert werden kann. Außerdem wäre es interessant, trotz der negativen Komplementation, die Bindung von Aldolase an die zytoplasmatische Domäne von MTI-1 zu testen.

Gilberger *et al.* konnten zeigen, dass die C-terminale Domäne von TRAP die entsprechende Domäne von EBA175, einem Mitglied der *erythrocyte binding ligand family* (EBL), ersetzen kann (Gilberger *et al.*, 2003). Die Autoren postulierten sogar EBA175 als das TRAP-Paralog in Blutstadien. Durch den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten TRAP-CTD-*swap*-Ansatz konnte allerdings eine funktionelle Komplementation der TRAP-CTD durch die von EBA175 nicht bestätigt werden (Abbildung 3.40 und Tabelle 3.6). Basierend darauf kann EBA175 funktionell nicht in die Familie der TRAP-Invasine zugeordnet werden. Auch hier wäre es interessant zu untersuchen, ob Aldolase mit der EBA175-CTD interagieren kann. Die zytoplasmatische Domäne von EBA175 zeigt bis auf das N-terminale Tyrosin-Motiv und das Vorhandensein negativ geladener Aminosäuren keine Homologien mit der TRAP-CTD (Abbildung 3.37). Durch die strukturellen Untersuchungen der Aldolase-Bindung (Jewett und Sibley, 2003; Buscaglia *et al.*, 2003) könnte dies eher auf eine nicht nachweisbare Interaktion hinweisen. Ob desweiteren die nicht vorhandene strukturelle Homologie der Domänen mit der negativen Komplementation korreliert werden kann, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Jedoch konnte auch durch das Einführen des konservierten Tryptophan-Restes, das zu einer TRAP-ähnlicheren zytoplasmatischen Domäne führen sollte, keine Komplementation erreicht werden (Abbildung 3.40 und Tabelle 3.6).

Dass die zytoplasmatische Domäne von EBA175 bei der Invasion von Erythrozyten eine Rolle spielt, konnte in der Arbeit von Gilberger *et al.* durch die Deletion der Domäne gezeigt werden (Gilberger *et al.*, 2003). Ob allerdings diese Domäne mit dem Aktin-Myosin-Motor interagieren kann, bleibt spekulativ. Eine interessante Hypothese wäre, dass TLP1 und EBA175 gemeinsam bei der Invasion agieren und TLP1 dabei die Verbindung zur Motormaschinerie gewährleistet. Denkbar wäre auch, dass EBA175 über ein noch unbekanntes Adaptorprotein mit TLP1 oder gar mit Proteinen der Motormaschinerie interagieren. Ähnlich könnten PTRAMP oder MTI-1 in diesen Prozess involviert sein.

Zusätzliche Proteine mit TSR-Domänen konnten auch in anderen invasiven Stadien gefunden werden. So wurde durch eine differentielle Transkriptomanalyse ein spezifisch in Sporozoiten exprimiertes TSR-Protein (S21; *thrombospondin-related sporozoite protein* (TRSP)) identifiziert (Kaiser *et al.*, 2004). Die genaue Funktion von TRSP ist noch unklar, allerdings wurde von den Autoren diskutiert, dass das Protein vielleicht zusammen mit TRAP oder CSP bei der Interaktion zwischen Sporozoit und Wirt agiert.

Zusätzlich zu der Expression von TLP1 in Schizonten konnten sowohl Transkripte als auch das Protein in Gametozyten und Sporozoiten nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1.3; Abschnitt 3.1.5), worauf eine zusätzliche Funktion des Proteins in diesen Stadien nicht ausgeschlossen werden kann. Die Expressions-Daten werden dadurch unterstützt, dass Transkripte von *TLP1* in verschiedenen cDNA-Bibliotheken nachgewiesen werden konnten. Diese umfassen sowohl eine *Pf* Gametozyten-EST (*expressed sequence tags*)-Bibliothek (*accession number* CA856060) als auch eine *Py* Sporozoiten-EST (Kappe *et al.*, 2001)- und cDNA-Bibliothek von axenischen Leberstadien (Wang *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte auch die Expression der Merozoiten-Oberflächenproteine AMA1 und EBA175 sowohl auf Transkript- als auch auf Protein-Ebene in Sporozoiten detektiert werden (Silvie *et al.*, 2004; Grüner *et al.*, 2001). Für AMA1 konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass das Protein bei der Invasion von Hepatozyten involviert ist. Antikörper gegen das Protein inhibierten die Invasion von Sporozoiten in Leberzellen *in vitro* (Silvie *et al.*, 2004).

Basierend auf einer durch Antikörper-vermittelten Inhibition der Invasion wäre es interessant zu untersuchen, ob durch die Anwesenheit von Antikörpern gegen TLP1 die Invasion von Erythrozyten blockiert werden kann. Antikörper sowohl gegen AMA1 als auch gegen EBA175 konnten die Invasion in rote Blutkörperchen *in vitro* hemmen (Thomas *et al.*, 1984; Kocken *et al.*, 1998; Kocken *et al.*, 2000; Sim *et al.*, 1990). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Antiserum gegen



die extrazelluläre Domäne von *P. berghei*-TLP1 hergestellt (Abschnitt 3.1.4). Durch das Fehlen eines *in vitro*-Kultursystems für *P. berghei*-Blutstadien wird die Verwendung des Antiserums für diese Analyse erschwert. Diesbezüglich wäre vorstellbar, die Invasions-Inhibition *in vivo* zu untersuchen, indem entweder der Antikörper mit *P. berghei*-Schizonten *in vitro* vor-inkubiert und anschließend in Tiere injiziert wird, oder das Tier mit Antikörper vorbehandelt wird. Ein Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des TLP1-Orthologs in *P. falciparum* wäre hilfreich, da hier ein *in vitro*-Kultursystem gegeben ist (Trager und Jensen, 1976).

Alternativ zu inhibierenden Antikörpern könnte das Eindringen von Merozoiten in Erythrozyten auch durch rekombinant hergestellte Fragmente der Exodomäne von TLP1 gehemmt werden. Diese würden mit den Parasiten um die Rezeptorbindestellen auf den roten Blutkörperchen im Wettbewerb stehen. Mit Hilfe von Peptiden, die von *P. falciparum* AMA1 abgeleitet wurden, konnte die Invasion von Erythrozyten inhibiert werden (Urquiza *et al.*, 2000). In analogen Ansätzen könnte auch untersucht werden, ob TLP1 eine Funktion in Sporozoiten ausübt.

Ein für die Invasion wichtiger Prozess ist die Prozessierung der daran beteiligten Oberflächenproteine (Carruthers und Blackman, 2005). Dies betrifft sowohl die Prozessierung zum nativen Protein als auch die während des Invasions-Prozesses stattfindende Proteolyse. Letztere kann, in Abhängigkeit vom Oberflächenprotein, durch zwei Mechanismen stattfinden, die als *shaving* bzw. *capping* bezeichnet werden (Carruthers und Blackman, 2005). Beide Mechanismen unterscheiden sich dabei im zeitlichen Auftreten während der Invasion und dem Bereich der proteolytischen Spaltung innerhalb des Proteins. Die Proteolyse durch den *shaving*-Mechanismus findet konstitutiv während des Invasionsprozesses statt und die Proteine werden dabei direkt an der Plasmamembran des Parasiten prozessiert. Hingegen findet die durch den *capping*-Mechanismus vermittelte Spaltung der Oberflächenproteine in den letzten Sekunden der Invasion, innerhalb der Transmembrandomäne, statt. Proteasen verschiedener Familien werden diskutiert, diese Prozesse zu vermitteln. Die für TRAP beschriebene Prozessierung (Kappe *et al.*, 1999; Bhanot *et al.*, 2003; Silvie *et al.*, 2004) konnte auf die Aktivität einer parasiten-eigenen Serin-Protease zurückgeführt werden (Silvie *et al.*, 2004). Die proteolytische Spaltung der an der Invasion von Erythrozyten beteiligten Proteine MSP-1 und AMA1 wird durch eine membran-assoziierte (Calcium-abhängige) Serin-Protease vermittelt, die allgemein als MESH (*merozoite surface sheddase*) bezeichnet wird (Carruthers und Blackman, 2005; O'Donnell und Blackman, 2005). Der momentan beste Kandidat für diese Protease ist SUB2, bei der es sich um eine membran-assoziierte subtilisin-ähnliche Protease (*subtilisin-like protease*; SUB) handelt.

Die im Rahmen der Expressions-Analysen zu *TRAP-like protein 1* (Abbildung 3.10 und 3.11) detektierten Doppelbanden könnten auf eine mögliche Prozessierung des Proteins hinweisen. Eine Möglichkeit zur Analyse, ob diese zusätzliche Proteinbande auf die Aktivität von Proteasen zurückzuführen ist, wäre die Verwendung spezifischer Protease-Inhibitoren. Beim Vorliegen einer Prozessierung durch eine Protease sollte durch die Inhibitoren die zusätzliche Proteinbande nicht mehr detektierbar sein. Basierend darauf wäre es weiterhin interessant, die Domäne im Protein in der die Spaltung stattfindet, genauer definieren zu können. Für Proteine der TRAP-Familie (und weitere in Mikronemen lokalisierten Transmembranproteine) wird postuliert, dass sie in der Transmembrandomäne prozessiert werden. Dies basiert größtenteils auf Arbeiten in *T. gondii*, durch die außerdem Proteasen der Rhomboid-Familie mit diesem Prozess in Verbindung gebracht werden konnten (O'Donnell und Blackman, 2005). Auch im Genom von *Plasmodium* konnten rhomboid-ähnliche Gene identifiziert werden. Zusätzlich konnte die Aktivität einer rhomboid-ähnlichen Protease auf der Merozoitenoberfläche beschrieben werden. Mitglieder der DBL-EBP (*Duffy-binding ligand-erythrocyte binding proteins*)-Familie besitzen das GA/GG-Motiv in der Transmembrandomäne, das als wichtig für die Substrat-Erkennung durch diese Klasse von Proteasen diskutiert wird (Carruthers und Blackman, 2005). Ob es sich hierbei allerdings um physiologische Substrate handelt, muss noch genauer untersucht werden. In der Transmembrandomäne von *P. berghei* TLP1 ist ein GA-Motiv zu finden, allerdings ist dieses im Gegensatz zu den DBL-EBP-Proteinen im C-terminalen Bereich der Domäne lokalisiert. Genaue Einblicke in die mögliche Prozessierung von TLP1 erfordern weitere Experimente die zeigen sollen, ob ein solcher Prozess stattfindet und welche Klasse von Proteasen dies vermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein bisher nicht identifiziertes Mitglied der TRAP-Familie charakterisiert werden. Für TLP1 konnte gezeigt werden, dass es die Eigenschaften eines Merozoiten-Invasins besitzt. Im Zusammenspiel mit weiteren Merozoiten-Oberflächenproteine könnte TLP1 funktionell die Rückwärtsbewegung der Verbindung zwischen Parasiten- und Wirtszellmembran (*tight junction*) vermitteln, so dass sich der Merozoit in den Erythrozyt bewegen kann. Durch die Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von TLP1 mit Aldolase wird die Verbindung mit dem Aktin-Myosin-Motor gewährleistet, die für eine aktive Invasion benötigt wird. Diese Arbeit ist außerdem die erste systematische funktionelle Charakterisierung von TRAP-Invasinen. Zusätzlich zu TLP1 konnte, erwartungsgemäß, CTRP als Mitglied dieser *Apicomplexa*-spezifischen Protein-Familie charakterisiert, und EBA175 und MTI-1 als Kandidaten ausgeschlossen werden.

## Addendum

Unmittelbar vor Abgabe dieser Arbeit veröffentlichten Cowman und Mitarbeiter die Identifizierung TRAP-ähnlicher Proteine in *P. falciparum* (Baum *et al.*, 2006). Hierbei fokussierten die Autoren hauptsächlich auf MTT-1, dort als MTRAP (*merozoite specific TRAP homolog*) bezeichnet, identifizierten aber unter anderen auch TLP1 (PFF0800w). Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit konnten die Autoren jedoch keine *TLP1*-Transkripte in *P. falciparum*-Blutstadien nachweisen. Desweiteren kontrovers ist die Expression von *TRAP* während des asexuellen Zyklus, die von Baum *et al.* nicht (Baum *et al.*, 2006), jedoch im Rahmen dieser Arbeit als positiv (Abbildung 3.1 und 3.2), gezeigt werden konnte. In dieser publizierten Arbeit wurde die Bindung von Aldolase an die zytoplasmatische Domäne von MTT-1 detektiert und das Protein als das funktionelle Äquivalent zu TRAP in Blutstadien postuliert. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Komplementationsanalysen widersprechen diesem insofern, als dass die C-terminale Domäne von MTT-1 die entsprechende Region von TRAP funktionell nicht ersetzen kann (Abbildung 3.45(B) und Tabelle 3.7).

## 5. Zusammenfassung

*Plasmodium*-Parasiten durchlaufen einen komplexen Lebenszyklus in zwei Wirten und müssen jeweils spezifisch verschiedene Zelltypen invadieren. In Sporozoiten und Ookineten konnten Mitglieder der TRAP-Familie als Invasine charakterisiert werden. Im Gegensatz dazu ist das Protein, das den Eintritt der Merozoiten in die Erythrozyten vermittelt, noch nicht bekannt. Die Merozoiten-Invasion verläuft in mehreren Schritten, die aus einer reversiblen Adhäsion, einer Re-Orientierung des apikalen Pols, einer irreversiblen Adhäsion begleitend mit der Ausbildung einer elektronen-dichten Verbindung (*tight junction*) und dem Eintritt der Parasiten in die Wirtszelle bestehen. Es konnten zwar Proteine des Parasiten identifiziert werden, die bei der Erythrozyten-Invasion beteiligt sind, jedoch ist deren direkte Funktion bei der aktiven Invasion weitgehend ungeklärt. Proteine der TRAP-Familie übertragen eine extrazelluläre Bindung an ein Substrat oder Rezeptor an die Motormaschinerie des Parasiten, wodurch dieser aktiv in die Wirtszelle eindringen kann.

Datenbankanalysen zeigten, dass im Genom von *P. falciparum* ein weiteres Protein zu finden ist, das die charakteristischen, strukturellen Merkmale von Invasinen der TRAP-Familie aufweist. Dieses Protein, TLP1 (*TRAP-like protein 1*), besitzt extrazellulär zwei von Willebrand A-Domänen die durch einen TSR (*thrombospondin type I repeat*) voneinander getrennt werden, eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne, die durch eine Ansammlung negativer Aminosäure-Reste und ein konserviertes C-terminales Tryptophan gekennzeichnet ist. TLP1 ist in den Blutstadien exprimiert und ist während des asexuellen Wachstums in späten Schizonten angereichert. Ein charakteristisches Merkmal ist eine stadien-spezifisch essentielle Funktion der TRAP-Proteine. Dies trifft auch für *TLP1* zu. Mit Hilfe der reversen Genetik konnte gezeigt werden, dass *TLP1* für die Blutstadien-Entwicklung des Parasiten notwendig ist. Die zytoplasmatische Domäne (CTD) von Invasinen der TRAP-Familie wird durch Aldolase-Tetramere mit dem Aktin-Myosin-Motor verbunden. Mit Hilfe von *in vitro*-Bindungsstudien konnten wir zeigen, dass auch die Carboxy-terminale Domäne von TLP1 mit Aldolase interagiert. Ein wichtiger funktioneller Test für eine direkte Funktion in der Invasion sind *in vivo*-Komplementations-Studien, in denen gezeigt wird, ob die essentielle Funktion der zytoplasmatischen Domäne von TRAP durch orthologe Regionen von Kandidaten-Proteinen ersetzt werden kann. Die zytoplasmatischen Domänen von TLP1 und von CTRP, dem beschriebenen Ookineten-Invasin, können die TRAP-CTD-Mutante partiell retten. Mit diesem Ansatz konnte desweiteren EBA175, das in der Literatur als TRAP-Paralog in Blutstadien postuliert wurde, ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte MII-1, ein weiteres in der

Datenbank identifiziertes TRAP-ähnliches Protein, durch diese funktionelle Charakterisierung von dieser Invasin-Familie getrennt werden.

TLP1 erfüllt somit die Kriterien eines Invasins der TRAP-Familie in Blutstadien. Zusammen mit weiteren Merozoiten-Oberflächenproteinen könnte TLP1 die Translokation der Verbindung zwischen Parasiten- und Wirtszellmembran (*tight junction*) ausführen und somit die Invasion der Merozoiten in Erythrozyten vermitteln.

## 6. Summary

*Plasmodium* parasites pass through a complex life cycle in two hosts where they have to specifically invade different cell types. Members of the TRAP-family have been characterized as invasins in ookinete and sporozoite stages. In contrast, the protein that directs merozoite entry into host erythrocytes remains unidentified. Merozoite invasion is a multi-step process consisting of a reversible attachment followed by reorientation of the apical pole, irreversible adhesion under simultaneous formation of an electron-dense junction (tight junction) and entry of the parasites into the host cell. Numerous parasite proteins that are involved in erythrocytic invasion have been described but their direct function in the active invasion remains to be determined. TRAP-family proteins transmit an extracellular binding event of a substrate or receptor to the motor machinery of the parasite and direct active entry into the host cell.

Database searches identified an additional protein, which displays the characteristic structural properties of TRAP-family invasins. This protein, TLP1 (TRAP-like protein 1), contains in its extracellular portion two von Willebrand A-domains that are separated by one thrombospondin type I repeat (TSR), followed by a transmembrane domain and a short cytoplasmic tail (CTD). The CTD contains a typical cluster of negatively charged amino acids and the conserved C-terminal tryptophan. TLP1 is expressed in the asexual blood stages and is enriched in late schizont stages during asexual growth. A hallmark of TRAP-family proteins is a stage-specific vital function. This is also the case for *TLP1*. By using reverse genetics I was able to show that *TLP1* is essential for blood stage development of the parasite.

The CTD of TRAP-family invasins is connected via aldolase tetramers to the actin-myosin-motor. By *in vitro*-binding studies we were able to show that the carboxy-terminal domain of TLP1 also interacts with aldolase. An important functional test for a direct function during invasion are *in vivo*-complementation studies. I tested whether the essential function of the TRAP cytoplasmic domain can be replaced by ortholog regions of candidate proteins. The cytoplasmic domains of TLP1 and the described ookinete invasin CTRP can partially rescue the TRAP-CTD-mutant.

Using this approach I was further able to exclude EBA175, a putative TRAP paralog in blood stages. Additionally MII-1, another TRAP-like protein identified by sequence analysis, could be functionally excluded from the invasin family.

Thus, TLP1 fulfils the criteria of a TRAP-family invasin in blood stages. In concert with additional merozoite surface proteins TLP1 may direct translocation of the moving tight junction and thus mediate merozoite invasion into erythrocytes.

## 5. Literaturverzeichnis

- Adams J. H., Blair P. L., Kaneko O., Peterson D. S.** (2001) An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 17:297-299.
- Aikawa M., Miller L. H., Johnson J., Rabbege J.** (1978) Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol.* 77:72-82.
- Alonso P. L., Sacarlal J., Aponte J. J., Leach A., Macete E., Milman J., Mandomando I., Spiessens B., Guinovart C., Espansa M., Bassat Q., Aide P., Ofori-Anyinam O., Navia M. M., Corachan S., Ceuppens M., Dubois M.-C., Demoitié M.-A., Dubovsky F., Menéndez C., Tornieporth N., Ripley Ballou W., Thompson R., Cohen J.** (2004) Efficacy of the RTS,S/ASO2A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet.* 364:1411-1420.
- Alonso P. L., Sacarlal J., Aponte J. J., Leach A., Macete E., Aide P., Sigauque B., Milman J., Mandomando I., Bassat Q., Guinovart C., Espansa M., Corachan S., Lievens M., Navia M. M., Dubois M.-C., Menéndez C., Dubovsky F., Cohen J., Thompson R., Ripley Ballou W.** (2005) Duration of protection with RTS,S/ASO2A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet.* 366(9502):2012-2018.
- Andrews K. T., Lanzer M.** (2002) Maternal malaria: *Plasmodium falciparum* sequestration in the placenta. *Parasitol Res.* 88(8):715-723.
- Bannister L. H., Hopkins J. M., Dluzewski A. R., Margos G., Williams I. T., Blackman M. J., Kocken C. H., Thomas A. W., Mitchell G. H.** (2003) *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *J Cell Science.* 116:3825-3834.
- Baty B. Y., Marquardt W. C.** (1996) Biology of disease vector. University Press of Colorado, USA.
- Baruch D. I., Pasloske B. L., Singh H. B., Bi X., Ma X. C., Feldman M., Taraschi T. F., Howard R. J.** (1995) Cloning the *P. falciparum* gene coding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell.* 82(1):77-87.
- Baum J., Richard D., Healer J., Rug M., Krnajski Z., Gilberger T.-W., Green J. L., Holder A. A., Cowman A. F.** (2006) A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other Apicomplexan parasites. *J Biol Chem.* Im Druck.
- Bhanot P., Frevert U., Nussenzweig V., Persson C.** (2003) Defective sorting of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) inhibits *Plasmodium* infectivity. *Mol Biochem Parasitol.* 126:263-273.
- Billker O., Lindo V., Panico M., Etienne A. E., Paxton T., Dell A., Rogers M., Sinden R. E., Morris H. R.** (1998) Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature.* 392:289-292.

- Bergman L. W., Kaiser K., Fujioka H., Coppens I., Daly T. M., Fox S., Matuschewski K., Nussenzweig V., Kappe S. H. I.** (2003) Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *J Cell Sci.* 116:39-49.
- Bonifacino J. S., Dell'Angelica E. C.** (1999) Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol.* 145:923-926.
- Bottius E., Ben Mohamed L., Brahimi K., Gras H., Lepers J. P., Raharimalala L., Aikawa M., Meis J., Slierendregt B., Tartar A., Thomas A., Druilhe P.** (1996) A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and CTL epitopes. *J Immunol.* 156:2874-2884.
- Buscaglia C. A., Coppens I., Hol W. G. J., Nussenzweig V.** (2003) Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium*. *Mol Biol Cell.* 14:4947-4957.
- Camus D., Hadley T. J.** (1985) A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science.* 230:553-556.
- Carvalho T. G., Thiberge S., Sakamoto H., Ménard R.** (2004) Conditional mutagenesis using site-specific recombination in *Plasmodium berghei*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:14931-14936.
- Carruthers V. B., Blackman M. J.** (2005) A new release on life: emerging concepts in proteolysis and parasite invasion. *Mol Microbiol.* 55(6):1617-1630.
- Chattopadhyay R., Rathore D., Fujioka H., Kumar S., De la Vega P., Haynes D., et al.** (2003) PfSPATR, a *Plasmodium falciparum* protein containing an altered thrombospondin type I repeat domain is expressed at several stages of the parasite life cycle and is the target of inhibitory antibodies. *J Biol Chem.* 278:25977-25981.
- Cerami C., Frevert U., Sinnis P., Takacs B., Clavijo P., Santos M. J., Nussenzweig V.** (1992) The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell.* 70:1021-1033.
- Cooper J. A.** (1993) Merozoite Surface antigen-1 of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today.* 9:50-54.
- Cowan G., Krishna S., Crisanti A., Robson K.** (1992) Expression of thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Lancet.* 339:1412.
- Cowman A. F., Baldi D. L., Healer J., Mills K. E., O'Donnell R. A., Reed M. B., Triglia T., Wickham M. E., Crabb B. S.** (2000) Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells. *FEBS lett.* 476(1-2):84-88.
- Craig A., Scherf A.** (2000) Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol.* 115:129-143.
- Deans J. A., Thomas A. W., Alderson T., Cohen S.** (1984) Biosynthesis of a putative protective *Plasmodium knowlesi* merozoite antigen. *Mol Biochem Parasitol.* 11:189-204.



- Dessens J. T., Beetsma A. L., Dimopoulos G., Wengelnik K., Crisanti A., Kafatos F. C., Sinden R. E. (1999) CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *EMBO J.* 18:6221-6227.
- Dessens J. T., Mendoza J., Claudianos C., Vinetz L. M., Khater E., Hassard S., *et al.* (2001) Knockout of the rodent malaria chitinase *Pb* CHT1 reduces infectivity to mosquitoes. *Infect Immun.* 69:4041-4047.
- Dessens J. T., Sidén-Kiamos I., Mendoza J., Mahairaki V., Khater E., Vlachou D., Xu X.-J., Kafatos F. C., Louis C., Dimopoulos G., Sinden R. E. (2003) SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Mol Microbiol.* 49(2):319-329.
- de Koning-Ward T. F., Fidock D. A., Thathy V., Ménard R., van Spaendonk R.M., Waters A. P., Janse C. J. (2000) The selectable marker human dihydrofolate reductase enables sequential genetic manipulation of the *Plasmodium berghei* genome. *Mol Biochem Parasitol.* 106: 199-212.
- Dobrowolski J. M., Sibley L. D. (1996) *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* 84:933-939.
- Donahue C. G., Carruthers V. B., Gilk S. D., Ward G. E. (2000) The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. *Mol Biochem Parasitol.* 111:15-30.
- Duraisingh M. T., Maier A. G., Triglia T., Cowman A. F. (2003) Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and – independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:4796-4801.
- Dvorak J. A., Miller L. H., Whitehouse W. C., Shiroishi T. (1975) Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science.* 187:748-750.
- Dyer M., Day K. (2000) Expression of *Plasmodium falciparum* trimeric G proteins and their involvement in switching to sexual development. *Mol Biochem Parasitol.* 108(1):67-78.
- Fidock D. A., Bottius E., Brahimi K., Moelans I. I., Aikawa M., Konings R. N., Certa U., Olafsson P., Kaidoh T., Asavanich A. (1994) Cloning and characterization of a novel *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigen, STARP. *Mol Biochem Parasitol.* 64(2):219-232.
- Fraser T. S., Kappe S. H., Narum D. L., van Buskirk K. M., Adams J. H. (2001) Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Mol Biochem Parasitol.* 117:49-59.
- Frevert U., Sinnis P., Cerami C., Shreffler W., Takacs B., Nussenzweig V. (1993) Malaria circumsporozoite protein binds to heparin sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med.* 177:1287-1298.
- Frevert U., Sinnis P., Esko J. D., Nussenzweig V. (1996) Cell surface glycosaminoglycans are not obligatory for *Plasmodium berghei* sporozoite invasion *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol.* 76:257-266.

- Frevert U.** (2004) Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol.* 20(9):417-424.
- Frevert U., Engelmann S., Zougbedé S., Stange J., Ng B., Matuschewski K., Liebes L., Yee H.** (2005) Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol.* 3(6):e192.
- Gaffar F. R., Yatsuda A. P., Franssen F. F. J., de Vries E.** (2004a) A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 136:25-34.
- Gaffar F. R., Yatsuda A. P., Franssen F. F. J., de Vries E.** (2004b) Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun.* 72:2947-2955.
- Galinski M. R., Medina C. C., Ingravallo P., Barnwell J. W.** (1992) A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell.* 69:1213-1226.
- Gantt S., Persson C., Rose K., Birkett A. J., Abagyan R., Nussenzweig V.** (2000) Antibodies against thrombospondin-related anonymous protein do not inhibit *Plasmodium* sporozoite infectivity *in vivo*. *Infect Immun.* 68(6):3667-3673.
- Gaskins E., Gilk S., DeVore N., Mann T., Ward G., Beckers C.** (2004) Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol.* 165(3):383-393.
- Gaur D., Mayer D. C. G., Miller L. H.** (2004) Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol.* 34:1413-1429.
- Gardner M. J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R. W., Carlton J. M., Pain A., Nelson K. E., Bowman S., Paulsen I. T., James K., Eisen J. A., Rutherford K., Salzberg S. L., Craig A., Kyes S., Chan M. S., Nene V., Shallom S. J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Perteza M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M. W., Vaidya A. B., Martin D. M., Fairlamb A. H., Fraunholz M. J., Roos D. S., Ralph S. A., McFadden G. I., Cummings L. M., Subramanian G. M., Mungall C., Venter J. C., Carucci D. J., Hoffman S. L., Newbold C., Davis R. W., Fraser C. M., Barrell B.** (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 419:498-511.
- Gerold P., Schofield L., Blackman M. J., Holder A. A., Schwarz R. T.** (1996) Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface antigen-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 75:131-143.
- Gietz R. D., St-Jean A., Woods R. A., Schiestl R. H.** (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl Acids Res.* 25:1425.
- Gilberger T.-W., Thompson J. K., Reed M. B., Good R. T., Cowman A. F.** (2003) The cytoplasmic domain of the *Plasmodium falciparum* ligand EBA-175 is essential for invasion but not protein trafficking. *J Cell Biol.* 162(2):317-327.
- Girma J.P., Meyer D., Verweij C. L., Pannekoek H., Sixma J. J.** (1987) Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood.* 70:605-611.

- Goldberg D. E., Slater A. F.** (1992) The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitol Today*. 8(8):280-283.
- Goel V. K., Li X., Chen H., Liu S.-C., Chishti A. H., Oh S. S.** (2003) Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(9):5164-5169.
- Green J. L., Martin S. R., Fielden J., Ksagoni A., Grainger M., Yim Lim B. Y. S., Molloy J. E., Holder A. A.** (2006) The MTIP-Myosin A complex in blood stage malaria parasites. *J Mol Biol*. Im Druck.
- Grüner A. C., Brahimi K., Letourneur F., Renia L., Eling W., Snounou G., Druilhe P.** (2001) Expression of erythrocyte-binding antigen 175 in sporozoites and liver stages of *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*. 184:892-897.
- Guo N. H., Kruttsch H. C., Negre E., Vogel T., Blake D. A., Roberts D. D.** (1992) Heparin- and sulfatide-binding peptides from the type I repeats of human thrombospondin promote melanoma cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:3040-3044.
- Guyatt H. L., Corlett S. K., Robinson T. P., Ochola S. A., Snow R. W.** (2002) Malaria prevention in highland Kenya: indoor residual house-spraying vs. insecticide-treated bednets. *Trop Med Int Health*. 7(4):298-303.
- Hadley T. J., Klotz F. W., Pasvol G., Haynes J. D., McGinniss M. H., Okubo Y., Miller L. H.** (1987) *Falciparum* malaria parasites invade erythrocytes that lack glycophorin A and B (MkMk). Strain differences indicate receptor heterogeneity and two pathways for invasion. *J Clin Invest*. 80:1190-1193.
- Hall N., Karras M., Raine J. D., Carlton J. M., Kooje T. W. A., Berriman M., Florens L., Janssen C. S., Pain A., Christophides G. K., James K., Rutherford K., Harris B., Harris D., Churcher C., Quail M. A., Ormond D., Doggett J., Trueman H. E., Mendoza J., Bidwell S. L., Rajandream M.-A., Carucci D. J., Yates III J. R., Kafatos F. C., Janse C. J., Barrell B., Turner C. M. R., Waters A. P., Sinden R. E.** (2005) A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analysis. *Science*. 307:82-86.
- Han Y. S., Thompson J., Kafatos F. C., Barillas-Mury C.** (2000) Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO J*. 19(22):6030-6040.
- Healer J., Crawford S., Ralph S., McFadden G., Cowman A. F.** (2002) Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infection and Immunity*. 70:5751-5758.
- Heintzelman M. B., Schwartzman J. D.** (1997) A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J Mol Biol*. 271:139-146.
- Hodder A. N., Crewther P. E., Matthew M. L., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., Anders R. F.** (1996) The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem*. 271:29446-29452.

- Holder A. A., 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., 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., 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., Leland P., Schwartz A.L.** (1983) *In vitro* cultivation of the exoerythrocytic stage of *Plasmodium berghei* in a hepatoma cell line. *Am J Trop Med Hyg.* 32:682-684.
- Howell S. A., Withers-Martinez C., Kocken C. H. M., Thomas A. W., Blackman M. J.** (2001) Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem.* 276(33):31311-31320.
- Ishino T., Yano K., Chinzei Y., Yuda M.** (2004) Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol.* 2(1):0077-0084.
- Ishino T., Yano K., Chinzei Y., Yuda M.** (2005) Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol Microbiol.* 58(5):1264-1275.
- Ishino T., Chinzei Y., Yuda M.** (2005) A *Plasmodium* sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cell Microbiol.* 7(2):199-208.
- Jewett T. J., Sibley L. D.** (2003) Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in Apicomplexan parasites. *Mol Cell.* 11:885-894.
- Jethwaney D., Lepore T., Hassan S., Mello K., Rangarajan R., Jahnen-Dechent W., Wirth D., Sultan A. A.** (2005) Fetuin-A, a hepatocyte-specific protein that binds *Plasmodium berghei* thrombospondin-related adhesive protein: a potential role in infectivity. *Infect Immun.* 73(9):5883-5891.
- Kadota K., Ishino T., Matsuyama T., Chinzei Y., Yuda M.** (2004) Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(46):16310-16315.
- Kaiser K., Matuschewski K., Camargo N., Ross J., Kappe S. H. I.** (2004) Differential transcriptome profiling identifies *Plasmodium* genes encoding pre-erythrocytic stage-specific proteins. *Mol Microbiol.* 51(5):1221-1232.
- Kaiser K., Camargo N., Coppens I., Morrisey J. M., Vaidya A. B., Kappe S. H. I.** (2004) A member of a conserved *Plasmodium* protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 133:15-26.
- Kappe S. H. I., Noe A. R., Fraser T. S., Blair P. L., Adams J. H.** (1998) A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:1230-1235.

- Kappe S., Bruderer T., Gantt S., Fujioka H., Nussenzweig V., Ménard R.** (1999) Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in apicomplexan parasites. *J Cell Biol.* 147:937-943.
- Kappe S. H. I., Gardner M. J., Brown S. M., Ross J., Matuschewski K., Ribeiro J. M., Adams J. H., Quackenbush J., Cho J., Carucci D. J., Hoffman S. L., Nussenzweig V.** (2001) Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:9895-9900.
- Kappe S. H. I., Buscaglia C. A., Bergman L. W., Coppens I., Nussenzweig V.** (2004a) *Apicomplexan* gliding motility and host cell invasion: overhauling the motor model. *Trends Parasitol.* 20:13-16.
- Kappe S. H. I., Buscaglia C. A., Nussenzweig V.** (2004b) *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:29-59.
- Kariu T., Yuda M., Yano K., Chinzei Y.** (2002) MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J Exp Med.* 195(10):1317-1323.
- Kato K., Mayer D. C., Singh S., Reid M., Miller L. H.** (2005) Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:5552-5557.
- Klotz F. W., Hadley T. J., Aikawa M., Leech J., Howard R. J., Miller L. H.** (1989) A 60-kDa *Plasmodium falciparum* protein at the moving junction formed between merozoite and erythrocyte during invasion. *Mol Biochem Parasitol.* 36:177-186.
- Kocken C. H. M., van der Wel A. M., Dubbeld M. A., Narum D. L., van de Rijke F. M., van Gemert G.-J., van der Linde X., Bannister L. H., Janse C. J., Waters A. P., Thomas A. W.** (1998) Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *P. berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem.* 273:15119-15124.
- Kocken C. H. M., Narum D. L., Massougbdji A., Ayivi B., Dubbeld M. A., van der Wel A., Conway D. J., Sanni A., Thomas A. W.** (2000) Molecular characterisation of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. *Mol Biochem Parasitol.* 109:147-156.
- Krotoski W. A., Collins W. E., Bray R. S., Garnham P. C., Cogswell F. B., Gwadz R. W., Killick-Kendrick R., Wolf R., Sinden R., Koontz L. C., Stanfill P. S.** (1982) Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 31(6):1291-1293.
- Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Landau I., Chabaud A.** (1994) *Plasmodium* species infecting *Thammomys rutilans*: a zoological study. *Advances in Parasitol.* 33:50-90.
- Lawler J., Hynes R. O.** (1986) The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol.* 10:1635-1648.

- Lambros C., Vanderberg J. P.** (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* 65:418-420.
- Lee J.-O., Rieu P., Arnaout M. A., Liddington R.** (1995) Crystal structure of the A domain from the  $\alpha$  subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell.* 80:631-638.
- Lindl T.** (2000) Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lingelbach K., Joiner K. A.** (1998) The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci.* 111:1467-1475.
- Lucius R., Loos-Frank B.** (1997) Parasitologie. Grundlagen für Biologen, Mediziner, Veterinärmediziner. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Matuschewski K., Ross J., Brown S. M., Kaiser K., Nussenzweig V., Kappe S. H. I.** (2002a) Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage. *J Biol Chem.* 277:41948-41953.
- Matuschewski K., Nunes A. C., Nussenzweig V., Ménard R.** (2002b) *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *EMBO J.* 21:1597-1606.
- Meis J. F. G., Verhave J. P., Jap P. H. K., Meuwissen J. H. E. T.** (1983) An ultrastructural study on the role of Kupffer cells in the process of infection by *Plasmodium berghei* sporozoites in rats. *Parasitology.* 86:231-242.
- Meissner M., Schlüter D., Soldati D.** (2002) Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science.* 298:837-840.
- Meissner M., Krejany E., Gilson P. R., de Koning-Ward T. F., Soldati D., Crabb B. S.** (2005) Tetracycline analogue-related transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:2980-2985.
- Ménard R., Janse C. J.** (1997) Gene targeting in malaria parasites. *Methods.* 13:148-157.
- Ménard R., Sultan A. A., Cortes C., Altszuler R., van Dijk M. R., Janse C. J., Waters A. P., Nussenzweig R. S., Nussenzweig V.** (1997) Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature.* 385:336-340.
- Ménard R.** (2001) Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell Microbiol.* 3:63-73.
- Michishita M., Videm V., Arnaout M. A.** (1993) A novel divalent cation-binding site in the A domain of the  $\beta 2$  integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell.* 72:857-867.
- Mital J., Meissner M., Soldati D., Ward G. E.** (2005) Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (*Tg* AMA1) demonstrates that *Tg* AMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol Biol Cell.* 16:4341-4349.

- Mitchell G. H., Thomas A. W., Margos G., Dluzewski A. R., Bannister L. H.** (2004) Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun.* 72:154-158.
- Miller L. H., Baruch D. I., Marsh K., Doumbo O. K.** (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415:673-679.
- Morrisette N. S., Sibley L. D.** (2002) Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66:21-38.
- Mota M. M., Pradel G., Vanderberg J. P., Hafalla J. C., Frevert U., Nussenzweig R. S., Nussenzweig V., Rodriguez A.** (2001) Migration through of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science.* 291(5501):141-144.
- Mueller A.-K., Labaied M., Kappe S. H. I., Matuschewski K.** (2005) Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature.* 433:164-167.
- Myung J. M., Marshall P., Sinnis P.** (2004) The *plasmodium* circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 133(1):53-59.
- Narum D. L., Thomas A. W.** (1994) Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 67:59-86.
- Nevill C. G., Some E. S., Mung'ala V. O., Mutemi W., New L., Marsh K., Lengeler C., Snow R. W.** (1996) Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Int Health.* 1(2):139-146.
- O'Donnell R. A., Saul A., Cowman A. F., Crabb B. S.** (2000) Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related *Plasmodium* species. *Nature Med.* 6(1):91-95.
- O'Donnell R. A., Blackman M. J.** (2005) The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion. *Curr Opin Microbiol.* 8:422-427.
- Orlandi P. A., Sim B. K., Chulay J. D., Haynes J. D.** (1990) Characterization of the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 40(2):285-294.
- Pandey K. C., Singh S., Pattnaik P., Pillai C. R., Pillai U., Lynn A., Jain S. K., Chitnis C. E.** (2002) Bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175 elicits invasion inhibitory antibodies. *Mol Biochem Parasitol.* 123:23-33.
- Pasquetto V., Fidock D. A., Gras H., Badell E., Eling W., Ballou W. R., et al.** (1997) *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion is inhibited by naturally acquired or experimentally induced polyclonal antibodies to the STARP antigen. *Eur J Immunol.* 27:2502-2513.
- Peterson M. G., Marshall V. M., Smythe J. A., Crewther P. E., Lew A., Silva A., Anders R. F., Kemp D. J.** (1989) Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol.* 9(7):3151-3154.

- Pimenta P. F., Touray M., Miller L.** (1994) The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J Eukaryot Microbiol.* 41:608-624.
- Pinder J. C., Fowler R. E., Dluzewski A. R., Bannister L. H., Lavin F. M., Mitchell G. H., Wilson R. J. M., Gratzer W. B.** (1998) Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red blood cell invasion. *J Cell Sci.* 111:1831-1839.
- Printen J. A., Sprague G. F. Jr.** (1994) Protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics.* 138:609-619.
- Pradel G., Frevert U.** (2001) Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 33:1154-1165.
- Pradel G., Garapaty S., Frevert U.** (2002) Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol.* 45:637-651.
- Rawlings D. J., Kaslow D. C.** (1992) A novel 40-kDa membrane-associated EF-hand calcium-binding protein in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 267(6):3976-3982.
- Reed M. B., Caruana S. R., Batchelor A. H., Thompson J. K., Crabb B. S., Cowman A. F.** (2000) Targeted disruption of an erythrocyte binding antigen in *Plasmodium falciparum* is associated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:7509-7514.
- Robson K. J. H., Frevert U., Reckmann I., Cowan G., Beier J., Scragg I. G., Takehara K., Bishop D. H. L., Pradel G., Sinden R., Saccheo S., Muller H. M., Crisanti A.** (1995) Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *EMBO J.* 14:3883-3894.
- Robson K. J. H., Hall J. R. S., Jennings M. W., Harris T. J. R., Marsh K., Newbold C. I., Tate V. E., Weatherall D. J.** (1988) A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin, and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature.* 335:79-82.
- Rogers W. O., Malik A., Mellouk S., Nakamura K., Robers M. D., Szarfman A., Gordon D. M., Nussler A., Aikawa M., Hoffman, S. L.** (1992) Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:9176-9180.
- Sachs J., Malaney P.** (2002) The economic and social burden of malaria. *Nature.* 415:680-685.
- Sambroock J., Fritsch E. F., Maniatis T.** (1989) Molecular cloning. A laboratory Manual, Second Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- Schindler R., Weichselsdorfer E., Wagner O., Bereiter-Hahn J.** (2001) Aldolase-localization in cultured cells: cell type and substrate-specific regulation of cytoskeletal associations. *Biochem Cell Biol.* 79:719-728.
- Schüler H., Mueller A.-K., Matuschewski K.** (2005) Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS letters.* 579:655-660.



- Schmitz S., Grainger M., Howell S., Calder L. J., Gaeb M., Pinder J. C., Holder A. A., Veigel C. (2005) Malaria parasite actin filaments are very short. *J Mol Biol.* 349(1):113-125.
- Shin S. C., Vanderberg J. P., Terzakis J. A. (1982) Direct infection of hepatocytes by sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J Protozool.* 29:448-454.
- Shahabuddin M., Toyoshima T., Aikawa M., Kaslow D. C. (1993) Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Natl Acad Sci USA.* 90:4266-4270.
- Sibley L. D. (2004) Intracellular parasite invasion strategies. *Science.* 304:248-253.
- Sidjanski S., Vanderberg J. P., Sinnis P. (1997) *Anopheles stephensi* salivary glands bear receptors for region I of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 90:33-41.
- Silvie O., Rubinstein E., Franetich J.-F., Prenant M., Belnoue E., Rénia L., Hannoun L., Eling W., Levy S., Boucheix C., Mazier D. (2003) Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nature Med.* 9(1):93-96.
- Silvie O., Franetich J.-F., Charrin S., Mueller M. S., Siau A., Bodescot M., Rubinstein E., Hannoun L., Charoenvit Y., Kocken C. H., Thomas A. W., van Gemert G.-J., Sauerwein R. W., Blackman M. J., Anders R. F., Pluschke G., Mazier D. (2004) A role of apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem.* 279(10):9490-9496.
- Sim B. K. L., Orlandi P. A., Haynes J. D., et al. (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.
- Sim B. K., Toyoshima T., Haynes J. D., Aikawa M. (1992) Localization of the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen in micronemes of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 51(1):157-9.
- Sim B. K., Chitnis C. E., Wasniowska K., Hadley T. J., Miller L. H. (1994) Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science.* 264:1941-1944.
- Sinden R. E., Croll N. A. (1975) Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Parasitology.* 70:53-65.
- Sinden R. E., Billingsley P. F. (2001) *Plasmodium* invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol.* 17(5):209-212.
- Sinnis P., Clavijo P., Fenyo D., Chait B. T., Cerami C., Nussenzweig V. (1994) Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein. *J Exp Med.* 180:297-306.
- Smith J. D., Chitnis C. E., Craig A. G., Roberts D. J., Hudson-Taylor D. E., Peterson D. S., Pinches R., Newbold C. I., Miller L. H. (1995) Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell.* 82:101-110.

- Sterling C. R., Aikawa M., Vanderberg J. P.** (1973) The passage of *Plasmodium berghei* sporozoites through the salivary glands of *Anopheles stephensi*: an electron microscope study. *J Parasitol.* 59:593-605.
- Soldati D., Foth B. J., Cowman A. F.** (2004) Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends Parasitol.* 20:567-574.
- Stewart M. J., Vanderberg J. P.** (1988) Malaria sporozoites leave behind trails of circumsporozoite protein during gliding motility. *J Protozool.* 35(3):389-393.
- Storch V., Welsch U.** (2004) Systematische Zoologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Su X. Z., Heatwole V. M., Wertheimer S. P., Guinet F., Herfeld J. A., Wellems T. E.** (1995) The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell.* 82:89-100.
- Sultan A. A., Thathy V., Frevert U., Robson K. J., Crisanti A., Nussenzweig V., Nussenzweig R. S., Ménard R.** (1997) TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell.* 90:511-522.
- Tewari R., Ogun S. A., Gunaratne R. S., Crisanti A., Holder A. A.** (2005) Disruption of *Plasmodium berghei* merozoite surface protein 7 gene modulates parasite growth *in vivo*. *Blood.* 105:394-396.
- Thathy V., Ménard R.** (2002) Gene targeting in *Plasmodium berghei*. *Methods Mol Med.* 72:317-331.
- Thomas A. W., Deans J. A., Mitchell G. H., Alderson T., Cohen S.** (1984) The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* 13:187-199.
- Thompson J., Cooke R. E., Moore S., Anderson L. F., Janse C. J., Waters A. P.** (2004) PTRAMP; a conserved *Plasmodium* thrombospondin-related apical merozoite protein. *Mol Biochem Parasitol.* 134:225-232.
- Templeton T. J., Kaslow D. C.** (1997) Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Biochem Parasitol.* 84:13-24.
- Templeton T. J., Kaslow D. C., Fidock D. A.** (2000) Developmental arrest of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* within the mosquito midgut via CTRP gene disruption. *Mol Microbiol.* 36:1-9.
- Tomley F. M., Clarke L. E., Kawazoe U., Dijkema R., Kok J. J.** (1991) Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol.* 49:277-288.
- Trager W., Jensen J. B.** (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 193:673-675.

- Triglia T., Healer J., Caruana S. R., Hodder A. N., Anders R. F., Crabb B. S., Cowman A. F.** (2000) Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol.* 38(4):706-718.
- Trottein F., Triglia T., Cowman A. F.** (1995) Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Mol Biochem Parasitol.* 74:129-141.
- Tucker R. P.** (2004) The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:969-974.
- Turner G. D., Morrison H., Jones M., Davis T. M., Looreesuwan S., Buley I. D., Gatter K. C., Newbold C. I., Pukritayakamee S., Nagachinta B et al.** (1994) An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol.* 145(5):1057-1069.
- Urquiza M., Suarez J. E., Cardenas C., Lopez R., Puentes A., Chavez F., Calvo J. C., Patarroyo M. E.** (2000) *Plasmodium falciparum* AMA1 erythrocyte binding peptides implicate AMA1 as erythrocyte binding protein. *Vaccine.* 19:508-513.
- van der Wel A. M., Tomas A. M., Kocken C. M., Malhotra P., Janse C. J., Waters A. P., Thomas A. W.** (1997) Transfection of the primate malaria *Plasmodium knowlesi* using entirely heterologous constructs. *J Exp Med.* 185(8):1499-1503.
- van Dijk M. R., Waters A. P., Janse C. J.** (1995) Stable transfection of malaria parasite blood stages. *Science.* 268:1358-1362.
- van Dijk M. R., Douradinha B., Franke-Fayard B., Heussler V., van Dooren M. W., van Schaijk B., van Gemert G.-J., Sauerwein R. W., Mota M. M., Waters A. P., Janse C. J.** (2005) Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *Natl Acad Sci USA.* 102(34):12194-12199.
- Vanderberg J. P.** (1974) Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites. *J Protozool.* 21:527-537.
- Vinetz J. M., Valenzuela J. G., Spechi C. A., Aravind L., Langer R. C., Ribeiro J. M. C., Kaslow D. C.** (2000) Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut. *J Biol Chem.* 14:10331-10341.
- Vlachou D., Zimmermann T., Cantera R., Janse C. J., Waters A. P., Kafatos F. C.** (2004) Real-time, *in vivo* analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol.* 6(7):671-685.
- Wahlgren W., Carlson J., Helmby H., Hedlund I., Treutiger C. J.** (1992) Molecular mechanisms and biological importance of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87(3):323-329.
- Wan K. L., Carruthers V. B., Sibley L. D., Ajioka J. W.** (1997) Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol.* 84:203-214.

- Wang J., Tolan D. R., Pagliaro L.** (1997) Metabolic compartmentation in living cells: structural association of aldolase. *Exp Cell Res.* 237:445-451.
- Wang Q., Brown S., Roos D. S., Nussenzweig V., Bhanot P.** (2004) Transcriptome of axenic liver stages of *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol.* 137(1):161-168.
- Waters A. P., Thomas A. W., Deans J. A., Mitchell G. H., Hudson D. E., Miller L. H., McCutchan T. F., Cohen S.** (1990) A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*. *J Biol Chem.* 265(29):17974-17979.
- Waters A. P., Thomas A. W., van Dijk M. R., Janse C. J.** (1997) Transfection of malaria parasites. *Methods.* 13:134-147.
- Waters A. P., Mota M. M., van Dijk M. R., Janse C. P.** (2005) Malaria Vaccines: Back to the Future? *Science.* 307:528-530.
- Wellems T. E., Plowe C. V.** (2001) Chloroquine-resistant malaria. *J Inf Dis.* 184:770-776.
- Wirth D. F.** (2002) The parasite genome. Biological revelations. *Nature.* 419:495-496.
- Whittaker C. A., Hynes R. O.** (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/Integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell.* 13:3369-3387.
- Wu Y., Kirkman L. A., Wellems T. E.** (1996) Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:1130-1134.
- Yeka A., Banek K., Bakayita N., Staedke S. G., Kanya M. R., Talisuna A., Kironde F., Nsobyia S. L., Kilian A., Slater M., Reingold A., Rosenthal P. J., Wabwire-Mangen F., Dorsey G.** (2005) Artemisinin versus Nonartemisinin combination therapy for uncomplicated malaria: randomized clinical trials from four sites in Uganda. *PLoS Med.* 2(7):654-662.
- Yanisch-Perron, C., Vieira J., Messing J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33(1):103-119.
- Yoshida N., Potocnjak P., Nussenzweig V., Nussenzweig R. S.** (1981) Biosynthesis of Pb44, the protective antigen of sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J Exp Med.* 154:1225-1236.
- Yuda M., Sawai T., Chinzei Y.** (1999) Structure and expression of an adhesive protein-like molecule of mosquito invasive-stage malarial parasite. *J Exp Med.* 189(12):1947-1952.
- Yuda M., Ishino T.** (2004) Liver invasion by malarial parasites- how do malarial parasites break through the host barrier? *Cell Microbiol.* 6(12):1119-1125.
- Zieler H., Nawrocki J. P., Shahabuddin M.** (1999) *Plasmodium gallinaceum* ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* by interaction with a carbohydrate ligand. *J Exp Biol.* 202:485-495.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

---