

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplombiologe Markus Ganter
aus Limburg an der Lahn

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Regulation der Mikrofilamente im Malariaerreger *Plasmodium*

**Gutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer
Prof. Dr. Kai Matuschewski**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Parasitologie des Hygiene Instituts der Universität Heidelberg im Zeitraum von Oktober 2005 bis Februar 2009 unter Anleitung von Prof. Dr. Kai Matuschewski durchgeführt.

Teile dieser Dissertation sind zur Publikation eingereicht. Das Manuskript ist dem Appendix beigelegt.

Ganter M., Schüler H., and Matuschewski K.

Vital role for the *Plasmodium* actin capping protein (CP) beta-subunit in motility of the malaria transmission stage.

Neben der vorliegenden Dissertation sind weitere Ergebnisse in folgende Publikation eingeflossen (s. Appendix).

Kursula I., Kursula P., Ganter M., Panjikar S., Matuschewski K., and Schüler H.
(2008)

Structural Basis for Parasite-Specific Functions of the Divergent Profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure* **16**: 1638-1648.

Weitere Ergebnisse sind als Manuskript zur Publikation in Vorbereitung.

Siden-Kiamos I., Kunze A., Ganter M., Steinbüchel M., Hliscs M., Mendoza J., Janse C.J., Waters A.P., Sinden R.E., Louis C., and Matuschewski K.

Stage-specific knockdown via promoter swap reveals an essential role of *Plasmodium* myosin A in ookinete gliding motility.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Kai Matuschewski bedanken. Deinen Beitrag zu dieser Arbeit und zu meiner Ausbildung kann ich nicht in wenigen Worten beschreiben. Ganz wesentlich war sicher die Beantwortung vieler, vieler Fragen. Ich möchte aber auch Danke sagen für die Herausforderungen, vor die Du mich gestellt hast, dass ich eigene Ideen in Experimente umsetzen konnte und dass ich so viele verschiedene experimentelle Ansätze ausprobieren durfte. Die offene Arbeitsatmosphäre in Deiner Gruppe habe ich immer sehr geschätzt, ebenso wie den von Dir geförderten Austausch mit anderen im Labor, auf Konferenzen und darüber hinaus.

Auch an Herwig Schüler geht ein spezielles Dankeschön. Herwig, die Arbeit an den gemeinsamen Projekten hat mir immer sehr viel Spaß gemacht. Danke für die gute Zeit! Ohne diese Zusammenarbeit wäre die Dissertation um einige Seiten kürzer. Für Deine großartige Begleitung, auch mal über den Rand der Petrischale hinaus, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Michael Lanzer, der im Laufe des Studiums mein Interesse an der Parasitologie geweckt hat. Für die Chancen, die mir die Arbeit in Ihrer Abteilung bot, die motivierende Begleitung und natürlich für die Übernahme des Erstgutachtens möchte ich mich bei Ihnen bedanken.

Neben Kai Matuschewski wurde das *thesis advisory committee* durch Ralf Bartenschlager, Freddy Frischknecht und Markus Meißner komplettiert. Bei Ihnen allen möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken. Die stets konstruktive und richtungweisende Begleitung während der experimentellen Phase hat entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen. Wie Kai mussten sich auch Freddy und Markus neben den *TAC meetings* mit skurrilen Theorien und langatmigen Irrtümern beschäftigen, auch dafür ein großes Dankeschön.

Ein kolossales Dankeschön geht an die ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Matuschewski! Von Euch hab ich unglaublich viel gelernt und Ihr habt mich - in wechselnder Besetzung - vom Praktikanten bis zum Doktoranden gelotst. Eure große Unterstützung in jeder Hinsicht war und ist ausgezeichnet. Vielen Dank!

Natürlich sind bzw. waren die Matuschewski's zusammen mit Lanzer's, Frischknecht's, Meißner's, Schüler's, Kappes' und Borrmann's Teil einer größeren Abteilung. Bei Euch allen möchte ich mich für Eure große Hilfsbereitschaft, die vielen Gespräche und für die gute Zeit bedanken. An Sylvia Münter geht ein großes Dankeschön für die super Zeit am Mikroskop und um's Mikroskop herum.

Auch bei meinen Freunden außerhalb des Labors und bei meinen Brüdern möchte ich mich bedanken. Wie in den Jahren vor der Promotion, konnte ich mich auch währenddessen immer auf Euch verlassen. Lasst uns mal so weiter machen! Cheers to the Biology of Parasitism '06 Crew! I had an awesome time with you at, and beyond the „nerd summer camp“.

Ein umfassendes Dankeschön geht an meine Eltern. Der Anteil, den Ihr an dieser Arbeit habt, ist in Kürze nicht darzustellen. Im Laufe der Jahre konnte ich dank Eurer großartigen und uneingeschränkten Unterstützung viele berufliche und private Chancen wahrnehmen. Vielen lieben Dank dafür!

Zusammenfassung

Im Zentrum mannigfaltiger Bewegungen auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene steht ein Protein und dessen Eigenschaft Polymere zu formen: Actin. Um diese fundamentale Funktion erfüllen zu können, muss die Polymerisation von Actin und die Lebensdauer der Mikrofilamente präzise reguliert werden. Heute sind viele Proteine bekannt, die mit Actinmonomeren und / oder -polymeren interagieren. Ein großer Teil unseres Wissens über Actin, Zellmotilität und weitere motile Prozesse stammt von einfachen Modellorganismen, zu denen auch Arten der Gattung *Plasmodium* zählen. Diese obligat parasitär lebenden Einzeller stehen als Erreger der Malaria seit langem im Fokus der Forschung. Auf der Suche nach Interventionsstrategien wurde auch deren einzigartige actinabhängige Bewegung untersucht, die sog. *gliding motility*. Die Sequenzierung des *Plasmodium* Genoms unterstrich die Eigentümlichkeit dieser actinbasierten Bewegungsform. Anders als bei den meisten anderen Eukaryoten ist das Repertoire an actinbindenden Proteinen in Plasmodien erstaunlich klein: nur etwas mehr als ein Dutzend Proteine gehören dazu. Damit kann ein besseres Verständnis der Actinregulation in *Plasmodium* auch ganz neue Einblicke in altbekannte Prozesse liefern. Darüber hinaus könnten dringend benötigte neue Interventionsstrategien zur Bekämpfung von Malaria aufgezeigt werden. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das heterodimere *capping protein* und dessen Eigenschaft Actinfilamente durch die Interaktion mit dem + Ende zu stabilisieren. Angesichts der äußerst geringen intrinsischen Stabilität von *Plasmodium* Actin, könnte diese zelluläre Funktion besonders wichtig für den Parasiten sein.

In dieser Arbeit konnte ich an *P. berghei* zeigen, dass beide Untereinheiten unterschiedliche vitale Zellfunktionen erfüllen. *PbCP α* ist essentiell für die Proliferation in erythrozytären Stadien. Diese Funktion kann in vollem Umfang durch heterologes *P. falciparum* *CP α* übernommen werden, ist aber untrennbar mit der Funktion des actinbindenden C-Terminus verknüpft. Möglicherweise moduliert *CP α* Actin auch außerhalb des Parasiten, wie die unerwartete Lokalisierung andeutete.

Die *P. berghei* *CP β* erfüllt indes eine vitale Rolle für die Motilität von Parasitenstadien im *Anopheles* Vektor. Bereits *cp β (-)* Ookineten sind nur eingeschränkt motil, was deren Infektivität drastisch herabsetzt. In *cp β (-)* Sporozoiten manifestiert sich dieser Phänotyp weiter: sie sind nicht mehr zu produktiver Lokomotion in der Lage. Die Mehrzahl der Parasiten bleibt mit dem Mitteldarm assoziiert und eine Invasion der Speicheldrüsen findet nicht statt. *cp β (-)* Sporozoiten sind damit auch nicht mehr infektiös für den Wirbeltierwirt. Eine vollständige Unterbrechung des Lebenszyklus ist die Folge. Auf andere Entwicklungsprozesse des Parasiten, u.a. Schizogonie, Gametogonie und Sporogonie, wirkte sich das Fehlen von *PbCP β* jedoch nicht negativ aus.

Meine genetische Analyse konnte damit den Erstrnachweis für getrennte zelluläre Funktionen der *P. berghei* *CP* Untereinheiten liefern. Ich konnte diesen Befund in Actin-Polymerisationsversuchen mit den individuellen, aufgereinigten Untereinheiten belegen. Damit ist *P. berghei* *CP* das erste beschriebene *capping protein*, bei dem eine funktionelle Trennung der beiden Untereinheiten stattfand. Meine genetischen und biochemischen Daten stützen die These, dass die beiden *P. berghei* *CP* Untereinheiten ihre essentiellen Funktionen im Malaria-Parasiten als Homodimere erfüllen.

Summary

For a plethora of motile processes on the macroscopic and microscopic levels, one protein and its ability to form polymers is crucial: actin. In order to sustain this fundamental function, actin polymer formation and the life span of microfilaments are tightly regulated. Today, many proteins are known, which interact with actin monomers and / or polymers. Many insights into the actin regulatory processes came from simple model systems, including species of the genus *Plasmodium*. This obligate intracellular parasite is the causative agent of malaria. In search for new intervention strategies, researcher examined also the unique actin-based motility of *Plasmodium* parasites, known as gliding motility.

The sequence information of the *Plasmodium* genomes indicated many peculiarities of the parasite microfilament system. In marked contrast to other eukaryotes, the *Plasmodium* genome harbors only very few known homologues of actin regulatory proteins. Just little more than a dozen have been identified. Therefore, the limited repertoire of the *Plasmodium* microfilament system offers new insides into motility processes. The heterodimeric actin capping protein (CP) and its ability to stabilize filamentous actin is the focus of this thesis. To stabilize a filament, CP interacts with its fast growing + end. Given the very low intrinsic stability of *Plasmodium* actin, this cellular function may be central for fast parasite locomotion.

Utilizing the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*, I could demonstrate, that both CP subunits perform separate vital functions for the parasite. *PbCP α* is essential for proliferation in erythrocytic stages. This function can be complemented by the heterologous *P. falciparum CP α* and relies crucially on the actin binding function of the C-terminus. Due to the unexpected surface localization, the α subunit may also modulate host cell actin during intraerythrocytic replication.

P. berghei CP β , in contrast, plays a vital role for the anopheline stages of the parasite. *cp β (-)* ookinetes are impaired in productive locomotion, which translates into a drastically reduced infectivity. This motility phenotype is fully apparent in *cp β (-)* sporozoites, which no longer glide in a productive manner. Most sporozoites stay associated with the mosquito midgut. Salivary glands are not colonized and *cp β (-)* sporozoites are no longer infective to susceptible animals. This phenotype translates into a complete arrest of parasite lifecycle progression. Intriguingly, other *Plasmodium* developmental processes, e.g. schizogony, gametogony and sporogony, seem to be unaffected.

Incidentally, my genetic analysis demonstrates for the first time that, both *P. berghei* CP subunits function individually. In support of this finding, I could also demonstrate capping activity of each individual recombinant protein in actin polymerization assays.

In conclusion, this study characterizes *P. berghei* CP as the first capping protein, where distinct essential functions are shared by two subunits. My experimental genetics and biochemical results support the idea, that the *P. berghei* capping protein subunits perform their vital functions in the malaria parasites as homodimers, rather than heterodimers.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Zellmotilität, Mikrofilamente und Actinregulation	1
1.1.1 Actin Biochemie	2
1.1.2 Zellmigration und die Funktion regulatorischer Proteine	3
1.1.3 Pathogene nutzen die Actin-Maschinerie der Wirtszelle zur eigenen Fortbewegung	10
1.2 <i>Plasmodium</i> Sporozoiten als Modell für Actinregulation und Zellmotilität	10
1.2.2 Die spezielle Lokomotion invasiver <i>Plasmodium</i> Stadien	14
1.3 Das <i>capping</i> Protein	19
1.3.1 Vorkommen, Eigenschaften und Struktur	19
1.3.2 CP stabilisiert das + Ende von Actinfilamenten	21
1.3.3 Regulation von CP	22
1.3.4 Die Rolle von CP in zellulären Prozessen	24
1.3.5 Das <i>capping protein</i> in <i>Plasmodium</i>	28
1.4 Zielsetzung der Arbeit	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Geräte	29
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.3 Chemikalien	31
2.1.4 Marker, Puffer, Medien und Lösungen	31
2.1.5 Verwendete <i>Kits</i>	32
2.1.6 Verwendete Proteine	32
2.1.7 Sequenzierungsreaktionen und Oligonukleotide	33
2.1.8 Vektoren	34
2.1.9 Zelllinien und Bakterienstämme	35
2.1.10 Tierstämme und Tierhaltung	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	36
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.3 Mikrobiologische Methoden	41
2.2.4 Kultivierung von <i>Aedes aegypti</i> Mos20 Zellen	42
2.2.5 Tierexperimentelle Methoden	42
2.2.6 Methoden zu <i>Plasmodium berghei</i>	43

3. Ergebnisse	51
3.1 Das <i>Plasmodium capping protein</i>	51
3.2 Die zelluläre Rolle von CP β für <i>P. berghei</i>	55
3.2.1 Depletion von <i>PbCPβ</i> in Parasiten	55
3.2.2 <i>Pbcpβ(-)</i> Parasiten zeigen keinen Defekt in den pathogenen Blutstadien.....	57
3.2.3 <i>Pbcpβ(-)</i> Parasiten formen sexuelle Stadien und Ookineten	58
3.2.4 Der Verlust von CP β beeinträchtigt die Infektivität von Ookineten	59
3.2.5 <i>cpβ(-)</i> Sporozoiten sind nicht fähig den Lebenszyklus im Moskito-Vektor zu vollenden	63
3.2.6 Der <i>cpβ(-)</i> Phänotyp kann durch Kreuzung komplementiert werden	68
3.3 Die zelluläre Rolle von CP α für <i>P. berghei</i>	72
3.3.1 <i>PbCPα</i> erfüllt eine vitale Rolle in pathogenen Blutstadien.....	72
3.3.2 Die zelluläre Lokalisation der <i>Plasmodium α</i> Untereinheit.....	75
3.4 Die rekombinanten <i>P. berghei</i> CP Untereinheiten besitzen unabhängige <i>capping</i> -Aktivitäten ...	81
3.4.1 Die rekombinante Expression von <i>Plasmodium</i> CP	82
3.4.2 Analyse der <i>capping</i> -Aktivität von <i>PbCP</i>	84
4. Diskussion	87
5. Literaturverzeichnis.....	100
6. Appendix.....	118
6.1 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	118
6.2 Malaria und die klinische Symptomatik einer <i>Plasmodium</i> Infektion	119
6.3 Das <i>P. berghei</i> CP α Gen.....	120
6.4 Abkürzungen	121
6.5 Manuskript und Publikation	123

1. Einleitung

1.1 Zellmotilität, Mikrofilamente und Actinregulation

Bewegung von einzelnen Zellen ist ein fundamentaler Prozess und wichtig für Embryonalentwicklung, Wundheilung, Immunantwort und die Entwicklung spezialisierter Gewebe. Für die Verschaltung des menschlichen Gehirns müssen beispielsweise mehr als 1,5 Mio. km zelluläre Verbindungen geschaffen werden. Ohne gerichtete und kontrollierte Motilität einzelner Zellen, wäre dies nicht möglich (Pollard and Borisy, 2003). Abnormales Migrationsverhalten kann hingegen sehr schädlich sein; es ist typisch für Krebszellen, die Metastasen hervorrufen (Wang *et al.*, 2005). Diese Formen der Bewegung beruhen auf amöboider Bewegung ganzer Zellen oder Teile einer Zelle, wie z.B. Dendrite von Neuronen.

Ein Protein spielt eine zentrale Rolle für Zellmigration: Actin. In vielen eukaryotischen Zellen ist es das am weitesten verbreitete Protein (Pollard and Borisy, 2003) und spielt auch bei intrazellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Neben Endocytose (Kaksonen *et al.*, 2003; May *et al.*, 2000; Merrifield *et al.*, 2004) ist auch die Cytoplasmaströmung in pflanzlichen Zellen von Actin abhängig. Die Bewegung von Endosomen (Merrifield *et al.*, 1999) und Vesikeln (Rozelle *et al.*, 2000) zeigt eine Verbindung von Motilität und Actin. Darüber hinaus nutzen intrazelluläre Pathogene das Actincytoskelett der Wirtszelle zur eigenen Lokomotion (s. unten). Das bakterielle Homolog zu Actin ParM ist an der Segregation von Plasmiden während der Zellteilung beteiligt. Es bildet eine Art mitotische Spindel für Plasmide (Garner *et al.*, 2004).

Eine Eigenschaft von Actin ist für all diese Prozesse von zentraler Bedeutung: Actinmonomere, sog. globuläres Actin (G-Actin) ist in der Lage lange, fadenartige Polymere zu formen. Diese sog. Mikrofilamente (auch: filamentöses Actin oder F-Actin) sind durch eine rechtshändige, doppelhelikale Struktur charakterisiert. Die Kräfte, die für die oben beschriebenen Prozesse benötigt werden, können auf zwei verschiedenen Wegen generiert werden. Zum einen wird Kraft durch die Polymerisation selbst generiert, die zum Beispiel genutzt werden kann um Objekte zu verschieben. Dies bedarf einer genauen Regulation von ständigem Auf- und Abbau von Filamenten (s. unten). Zum anderen wird Kraft im Zusammenspiel von Mikrofilamenten und Motorproteinen der Myosin-Familie generiert. Dabei wandern Myosine unter Energieverbrauch an Actinpolymeren entlang und erzeugen so Kräfte. Hierbei sind Actinfilamente nicht in ständigem Auf- und Abbau begriffen. Im Gegenteil, es muss gewährleistet werden, dass Actinfilamente stabil und von gleichbleibender Länge sind. Die Kontraktion von Muskulatur beruht auf dieser Interaktion von Actin und Myosin (Alberts *et al.*, 2008).

Da in dieser Arbeit die Regulation von Actin im Vordergrund steht, soll im Folgenden das Hauptaugenmerk auf dynamische Actinstrukturen gelegt werden. Die Rolle der Actin-Myosin Interaktion für die Bewegung von Zellen soll nur an wenigen Stellen diskutiert werden.

Einzelne, sich bewegende Zellen nutzen beide Möglichkeiten um Vortriebskräfte zu erzeugen. Für die Untersuchung der molekularen Prozesse wurden sie daher oft herangezogen. Amöboide Migration ist eine urtümliche Art der Bewegung. Da die molekularen Mechanismen in Protozoen und Vertebraten konserviert sind, kann der Ursprung dieser Art von Lokomotion auf eine Zeit vor mehr als eine Milliarde Jahre zurückdatiert werden (Pollard and Borisy, 2003). Man kann amöboide Migration als zyklische Abfolge von vier Schritten beschreiben: Ausbildung von Zellfortsätzen (Scheinfüßchen oder Pseudopodien), Adhäsion auf dem Substrat, Kontraktion des Zellkörpers und dem Ablösen von Zell-Substrat-Kontakten. Dabei wird die Polymerisation von dynamischen Actinnetzwerken zur Ausbildung von Pseudopodien genutzt. Die Interaktion von Myosin und F-Actin wird hingegen genutzt um den Zellkörper zu kontrahieren.

Dynamische Actinstrukturen und ihre Regulation sollen im Folgenden genauer betrachtet werden. Sie sind seit langem im Fokus der Forschung über Actin und Zellmotilität.

1.1.1 Actin Biochemie

Actin ist in der Lage als Monomer und als Polymer in der Zelle vorzuliegen. Zur Polymerisation kann es kommen, da G-Actin andere Monomere mit einem Ende (+ Ende) binden kann und selbst von weiteren Monomeren am - Ende gebunden werden kann. Diese Eigenschaft verleiht F-Actin eine intrinsische Polarität. Das Ende eines Polymers, welches weitere Monomere binden kann wird + Ende genannt. Das Ende welches eine Bindestelle für G-Actin bietet wird - Ende genannt (Abb. 1 A).

Actin alleine polymerisiert nur schlecht, da Di- und Trimere sehr instabil sind. Ist spontane Polymerisation erst einmal gestartet, wachsen Mikrofilamente aber schnell. Die Polymerisationsrate ist diffusionsabhängig und entspricht der Zahl an Monomeren, die mit dem + Ende kollidieren. Etwa 2% dieser Kollisionen führen direkt zu einer Bindung (Drenckhahn and Pollard, 1986). Damit ist die Elongations- oder Assoziationsrate direkt proportional zur Konzentration an G-Actin. Für das + Ende liegt die Elongationsrate bei $11 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ oder 11 Monomeren / μM G-Actin / Sekunde. Das bedeutet: 10 μM G-Actin verlängern + Enden um 110 Untereinheiten pro Sekunde was $0,3 \mu\text{m}$ entspricht.

Das Verhältnis von Dissoziations- und Assoziationsrate bestimmt die sog. Kritische Konzentration. Alles Actin oberhalb der Kritischen Konzentration polymerisiert. Physiologisch relevant ist G-Actin, welches Mg-ATP gebunden hat; die ATP-Bindestelle liegt am - Ende des Monomers. Für diese Actinspezies ist die Kritische Konzentration am + Ende des Filaments ($0,1 \mu\text{M}$) niedriger als am - Ende ($0,7 \mu\text{M}$). Unter physiologischen Bedingungen liegt die G-Actin Konzentration zwischen diesen Werten, was zur Folge hat, dass + Enden wachsen während - Enden schrumpfen. Ein Prozess der als *treadmilling* (vom engl. *treadmilling* \approx sich in einem Laufrad bewegen) bezeichnet wird (Abb.1 A).

Gebundenes ATP stabilisiert G-Actin wird aber *per se* nicht für die Polymerisation benötigt (De La Cruz *et al.*, 2000). Allerdings gibt die Hydrolyse des ATP und die Dissoziation des γ -Phosphats das Alter des Filaments an. Die ATP-Hydrolyse ist irreversibel und sehr schnell. Gebundenes ATP hat eine Halbwertszeit von etwa 2 Sekunden (Blanchoin and Pollard, 2002; Carlier *et al.*, 1988). Das γ -Phosphat dissoziiert jedoch viel langsamer (Halbwertszeit ca. 350 sec.)(Carlier and Pantaloni, 1986). Ein einzelnes Filament kann also in drei Altersstufen eingeteilt werden: sehr junge (ATP-F-Actin),

etwas ältere (ADP-P_i-F-Actin) und alte (ADP-F-Actin) Abschnitte. Diesen „Alterungsprozess“ nutzt die Zelle zur Regulation von Filamenten. Zum Beispiel besitzen Proteine, die Dissoziation eines Filaments fördern eine höhere Affinität zu ADP-F-Actin (s. unten). Für das *treadmilling* ist die Hydrolyse von ATP daher essentiell.

Die spontane Actinpolymerisation ist selbst unter physiologischen Bedingungen sehr langsam. Polymere wachsen etwa mit einer Geschwindigkeit von 0,04 $\mu\text{m} / \text{min}$. Zellen können sich aber mit Geschwindigkeiten von bis zu 10 $\mu\text{m} / \text{min}$ bewegen. Einige, wie *Plasmodium*-Sporozoitien sogar mit bis zu 90 $\mu\text{m} / \text{min}$ (Vanderberg, 1974). Für diese Unterschiede sind regulatorische Proteine verantwortlich. Humane Zellen besitzen eine Vielzahl von actinbindenden Proteinen, die man in über 60 verschiedene Gruppen einteilen kann (Pollard and Borisy, 2003). Jedoch genügen einige wenige Proteine um *in vitro* auf Actin basierende Motilität zu erzeugen (Loisel *et al.*, 1999). Neben Actin sind dies: Proteine der ADF/cofilin Familie; das sog. *capping protein*, der Arp2/3 Komplex, ein Aktivator des Arp2/3 Komplex und Profilin. Am Beispiel von amöboider Zellmigration sollen die Funktionen dieser und einiger weiterer Proteine beschrieben werden.

1.1.2 Zellmigration und die Funktion regulatorischer Proteine

Um sich zu bewegen bilden Zellen Pseudopodien aus, die auf Grund ihrer Morphologie unterteilt werden können. Sind sie breit und flächig bezeichnet man sie als Lamellipodium (Abb. 1 B). Filopodien hingegen sind viel feiner, fadenartig dünn und oft verzweigt. Beide Formen können nicht selten gleichzeitig an einer Zelle beobachtet werden. Lamellipodien dienen dabei primär der Fortbewegung, während Filopodien wahrscheinlich als Sensor der lokalen Umgebung dienen (Abb. 1 C). Einige besondere Formen findet man bei verschiedenen Einzellern. Heliozoen besitzen so genannte Axopodien. Sie sind Filopodien nicht unähnlich haben aber einen zentralen Stützstab aus Mikrotubuli und stehen radiär vom Zellkörper ab. Foraminiferen besitzen eine für sie charakteristische Form von Pseudopodien. Diese Reticulopodien (= Rhizopodien) sind stark verzweigt und bilden viele Querverbindungen (Storch and Welch, 1997).

Actin ist der Masse nach der Hauptbestandteil von Pseudopodien und der Durchsatz an F-Actin am Vorderende der Zelle, dem sog. *leading edge*, ist enorm: Polymere werden in Bruchteilen einer Sekunde auf- und wieder abgebaut. Eine Reihe von Schlüsselexperimenten zeigte, dass Motilität tatsächlich mit Actinpolymerisation einhergeht und dass dabei die + Enden der Filamente zur Zelloberfläche hin ausgerichtet sind (Pollard and Borisy, 2003).

Um sich jedoch effizient Fortbewegen zu können müssen Zellen einige Voraussetzungen erfüllen: Zunächst muss die Polymerisationsrate von Actin beschleunigt werden; Filamentwachstum muss initiiert und terminiert werden; Membranen müssen vorgeschoben werden; die beteiligten Proteine müssen wieder zur Verfügung gestellt werden und externe sowie interne Signale müssen die Bewegung der Zelle regulieren. Die molekularen Mechanismen mit denen Zellen diese Voraussetzungen erfüllen sollen zunächst am Beispiel von Lamellipodien und später kurz am Beispiel von Filopodien besprochen werden (Abb. 1).

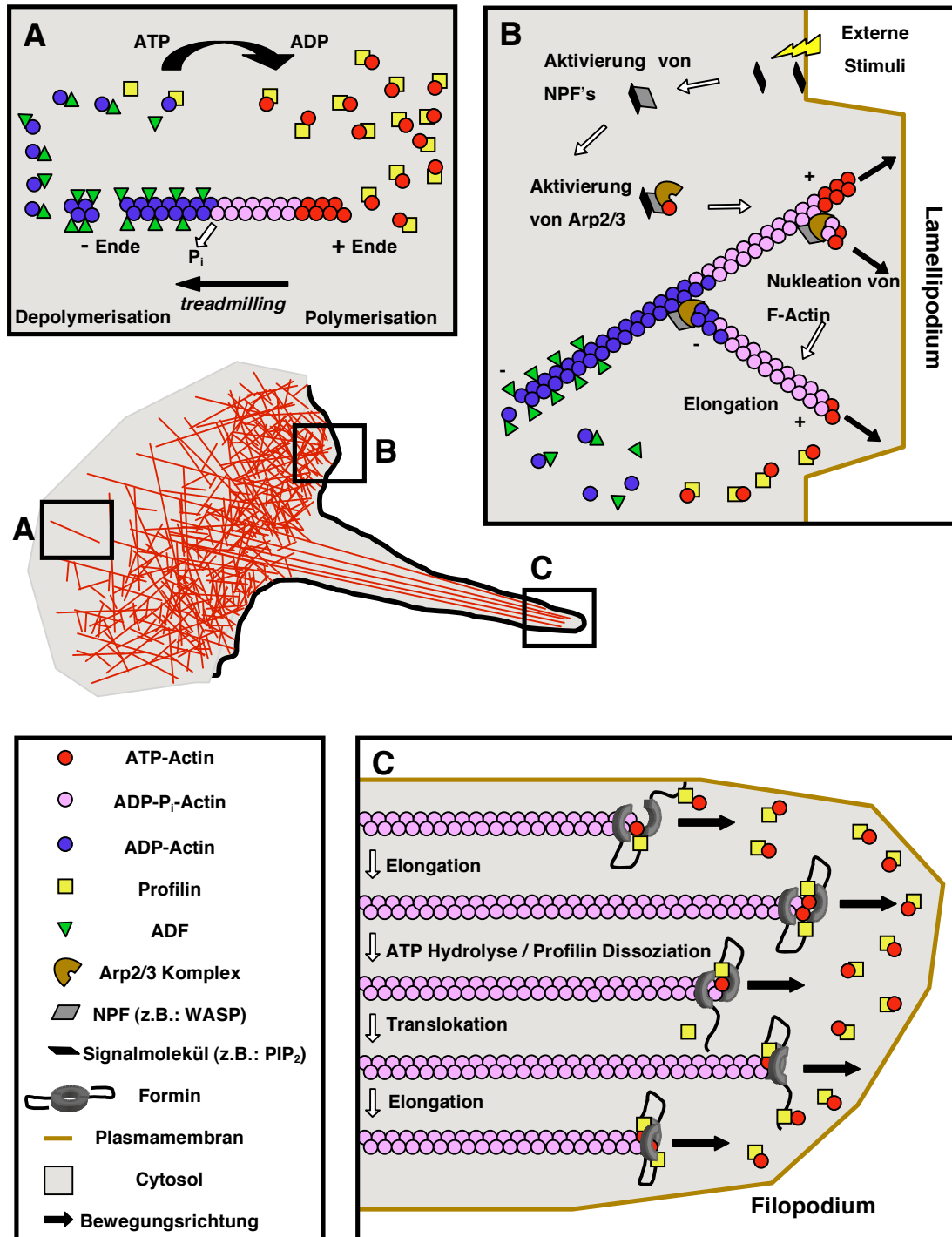


Abb. 1 Dynamische Actinstrukturen in motilen Zellen. In der Mitte ist ein Teil einer amöboid migrierenden Zelle schematisch dargestellt. Die dafür typischen Strukturen, Lamellipodium und Filopodium sind in kleinen Kästen eingerahmt (B bzw. C); Actin ist in rot gezeigt. In den großen Kästen sind der Auf- und Abbau von F-Actin (A) sowie die Actinstrukturen, die Lamellipodien (B) bzw. Filopodien (C) formen vereinfacht dargestellt. Die detaillierten Funktionsbeschreibungen der einzelnen zellulären Komponenten sind im Text zu finden. Ein Schlüssel zu den verwendeten Symbolen ist im Kasten unten links abgebildet; + und - geben die jeweiligen Enden des Filaments an.

Massive Sequestrierung von G-Actin erhöht die Monomerkonzentration weit über die Kritische Konzentration, wodurch explosionsartiges Filamentwachstum ermöglicht wird

Da die Elongationsrate proportional zur Konzentration an G-Actin ist, müssen Zellen eine große Zahl von Monomeren in einem polymerisierbaren Zustand halten. Schnelle Bewegungen benötigen eine

G-Actin Konzentration, die über einhundert Mal höher ist als die Kritische Konzentration (Pollard and Borisy, 2003). Um so hohe Konzentrationen zu erreichen kooperieren Proteine, die zum einen G-Actin sequestrieren und andere, die Filamentwachstum hemmen. Profilin ist wohl das prominenteste G-Actin sequestrierende Protein; alle eukaryotischen Zellen scheinen es zu exprimieren. Profilin hemmt spontane Nukleation von F-Actin, katalysiert aber den Austausch von ADP durch ATP (Abb. 1 A). Profilin hält G-Actin also in einem polymerisierbaren Zustand, daher auch der Name: von *pro filamentous* (Yarmola and Bubb, 2006). Durch die Bindung von Profilin am + Ende des Monomers erlaubt es nur Elongation am + Ende des Filaments. In Amöben ist die Profilin Konzentration hoch genug um alle Actinmonomere zu binden (Kaiser *et al.*, 1999; Vinson *et al.*, 1998). Wichtig für die Funktion von Profilin ist die Interaktion mit anderen regulatorischen Proteinen. Profilin kann gleichzeitig Actin und prolinreiche Domänen von Regulatoren wie Formin und WASP binden (Lu and Pollard, 2001). Durch diese Interaktionen werden Profilin/G-Actin Komplexe wachsenden Filamenten zugeführt (Abb. 1 A).

Höhere Eukaryoten besitzen mit Thymosin- β 4 ein weiteres G-Actin sequestrierendes Protein, welches jedoch im gebundenen Zustand jegliche Polymerisation hemmt. Da Profilin und Thymosin- β 4 um G-Actin konkurrieren, haben z.B.: humane Zellen zwei Pools von G-Actin. Einen Profilin gebundenen, der, wenn nötig, schnell polymerisieren kann. Und einen weiteren, Thymosin- β 4 gebundenen, nicht polymerisierbaren Pool in Reserve. Niederen Eukaryoten fehlt Thymosin- β 4, sie überleben ohne ein zweites System zur G-Actin Pufferung (Pollard and Borisy, 2003).

De novo Nukleation durch den Arp2/3 Komplex ist der wichtigste Mechanismus um dichte Actinnetzwerke in Lamellipodien zu etablieren

Für amöboide Migration ist ein dichtes Netzwerk aus Actin im Lamellipodium nötig. Um es zu bilden muss die Elongation von Mikrofilamenten initiiert werden. Dies kann auf verschiedenen Wegen geschehen. Zerteilung eines Filaments führt beispielsweise zur Entstehung neuer Enden, die dann ihrerseits verlängert werden können. Obwohl mehrere Mechanismen zur Initiation von Filamentwachstum beitragen, ist die *de novo* Nukleation durch den Arp2/3 Komplex (vom engl. *actin related protein 2/3*) der vorherrschende Mechanismus im Lamellipodium (Abb. 1 B). Die *de novo* Nukleation durch Formine ist hingegen in Filopodien dominierend (s. unten). Das kürzlich in *Drosophila* gefundene Spire ist ebenfalls zu Nukleation fähig, soll aber nicht weiter besprochen werden (besitzt 4 G-Actin bindende sog. V-Domänen, die so einen Nukleus formen (Quinlan *et al.*, 2005)).

Der Arp2/3 Komplex ist in einer Vielzahl von eukaryotischen Organismen zu finden, zum Teil in enormen Konzentrationen, z.B.: bis 10 μ M in Leukozyten (Higgs *et al.*, 1999). Es ist ein stabiler Komplex aus *actin related protein 2* und 3 sowie fünf weiteren Proteinen, die als ARPC 1 bis 5 (*actin related protein complex 1-5*) bezeichnet werden. Besonders wichtig für die Nukleation sind Arp2 und 3. Das + Ende der Arp2 und 3 Monomere ist dem von Actin sehr ähnlich, was für deren Funktion als Nukleus wichtig ist. Das - Ende hingegen besitzt eine andere Struktur als das von Actin. Dies verhindert Kopolymerisation mit Actin und die Polymerisation von Arp2 bzw. Arp3 Filamente (Pollard, 2007).

Die Kristallstruktur des Arp2/3 Komplex zeigte jedoch, dass der Komplex in dieser Form inaktiv ist, da Arp2 und 3 zu weit auseinander stehen um als Keim für Polymerisation dienen zu können (Robinson *et al.*, 2001). Der aktivierte Arp2/3 Komplex kann sowohl an + Enden als auch seitlich an existierende Filamente binden und initiiert Wachstum eines neuen Filaments. Dies geschieht typischerweise in einem Winkel von 70° (Mullins *et al.*, 1998). Diese Actinorganisation findet sich auch *in vivo*, z.B.: in Keratocyten (Svitkina *et al.*, 1997). Die Wirkungsweise des Arp2/3 Komplex, die ein dicht verzweigtes Netzwerk aus Mikrofilamenten zur Folge hat, wird als *dendritic nucleation* bezeichnet (engl. dendritic = verzweigt, verästelt; *nucleation* ~ Bildung eines Keims). Wie Actin können auch Arp2 und Arp3 ATP binden und durch ein konserviertes Histidin hydrolysieren (Vorobiev *et al.*, 2003). Arp3 scheint jedoch dauerhaft ATP gebunden zu haben. Arp2 hingegen bindet ATP erst nach Aktivierung des Komplexes und hydrolysiert ATP nachdem das neue Filament geformt wurde (Le Clainche and Carlier, 2008). ATP Hydrolyse durch Arp2 wird für die Reorganisation des Netzwerks benötigt und könnte der Zeitgeber dafür sein (Le Clainche and Carlier, 2008; Pollard, 2007).

Wie bereits erwähnt, muss der intrinsisch inaktive Arp2/3 Komplex aktiviert werden. Diese Rolle übernehmen sog. NPF's (vom engl. *nucleation-promoting factor*). Proteine der WASP Familie sind die wohl am besten beschriebenen Aktivatoren (von *Wiskott-Aldrich syndrome protein*). Menschen mit einer Mutation im hematopoetischen WASP leiden unter dem Wiskott-Aldrich Syndrom - einer Störung des Immunsystems und der Blutgerinnung. Patienten leiden unter einem Mangel an Blutplättchen (Thrombozytopenie), Ekzemen und rezidivierenden Infektionen. Die Lebenserwartung beträgt im Allgemeinen nicht mehr als zehn Jahre (Rengan and Ochs, 2000). Zu dieser Proteinfamilie gehören außerdem das ubiquitär exprimierte neural-WASP (N-WASP) und die verschiedenen Isoformen der Scar/WAVE Proteine (von: *suppressor of cAMP receptor 1 WASP-family verprolin homology protein*). Sie alle aktivieren den Arp2/3 Komplex, jedoch in verschiedenen Zelltypen oder nach verschiedenen Stimuli (Le Clainche and Carlier, 2008). Charakteristisch für die WASP Familie ist eine C-terminale Domäne (VCA-Domäne), die für die Aktivierung des Arp2/3 Komplex verantwortlich ist. Weitere Domänen regulieren die Aktivität von WASP. Die *verprolin homology domain* oder V-Domäne (*auch WASP homology, WH-2 Domäne* genannt) bindet G-Actin (Miki and Takenawa, 1998). Die C-terminale *acidic*- oder A-Domäne bindet den Arp2/3 Komplex (Machesky and Insall, 1998). Zwischen V- und A-Domäne liegt die C-Domäne (von *connecting sequence*), die sowohl mit G-Actin als auch mit Arp2/3 interagieren kann, jedoch nicht gleichzeitig (Kelly *et al.*, 2006). Actinfilamente interagieren ebenfalls mit der VCA Domäne und verbessern die Bindung an Arp2/3, was die seitliche Bindung des Arp2/3 Komplex an Filamente noch verstärkt (Marchand *et al.*, 2001). Die Kristallstruktur von Arp2/3 lässt vermuten, dass WASP Bindung eine Konformationsänderung bewirkt, die Arp2 und 3 in räumliche Nähe bringt (Robinson *et al.*, 2001), so dass ein stabiler Nukleus aus Arp2, Arp3 und dem WASP gebundenem G-Actin gebildet werden kann (Abb. 1 B).

Daneben gibt es aber noch eine Reihe weiterer Faktoren, die möglicherweise Arp2/3 aktivieren können oder als Koaktivatoren fungieren, z.B.: Cortactin in Vertebraten (Pollard, 2007). Auch Actinfilamente selbst fungieren als Koaktivatoren (Machesky *et al.*, 1999; Pantaloni *et al.*, 2000).

Capping terminiert die Mikrofilamentelongation

Nach kurzer Elongationsphase, etwa 1 sec, wird das Wachstum von Mikrofilamenten terminiert. Einige spezialisierte Proteine, binden an die Enden von Filamenten und verhindern weiteren Einbau von Monomeren, dieser Vorgang wird als *capping* bezeichnet (vom engl. *to cap* = bedecken). Ein ubiquitärer Vertreter ist das heterodimere *capping protein* (CP), dessen zelluläre Funktion weiter unten beschreiben wird. Daneben gibt es in höheren Eukaryoten weitere Proteine, wie z.B.: Gelsolin, das wie CP die + Enden von Mikrofilamenten stabilisiert (Sun *et al.*, 1994).

Die thermische Bewegung der Mikrofilamente schiebt die Plasmamembran vorwärts

Um Vortrieb zu erzeugen muss polymerisierendes Actin entweder untereinander oder mit dem Substrat verbunden werden. Andernfalls würden die auftretenden Kräfte die Filamente anstelle der Zelle bewegen. Verschiedene Proteine, wie z.B. Filamin, sind in der Lage F-Actin zu vernetzen (Cunningham *et al.*, 1992). Auch der Arp2/3 Komplex spielt dabei eine wichtige Rolle. Andere Proteine, wie z.B.: Tensin, verbinden Filamente mit Integrinen an Stellen, wo die Zelle am Substrat adhärert (sog. *focal adhesion sites*)(Le Clainche and Carlier, 2008).

Zu erklären, wie ein Filament wachsen und Vortrieb erzeugen kann, dessen Ende an einer Fläche anliegt, war lange Zeit ein Problem für viele Modelle. Die Antwort liegt in der Brown'schen Molekularbewegung und in der Ausrichtung der Filamente (Mogilner and Oster, 1996). Diese stehen nicht rechtwinklig zur Membran sondern in vielen verschiedenen Winkeln. Da Arp2/3 Winkel von 70° induziert, sind viele Filamente $\pm 35^\circ$ von der Senkrechten ausgerichtet (Maly and Borisy, 2001). Man stelle sich nun ein Filament als eine Art Feder vor, die Aufgrund thermischer Energie hin und her bewegt wird. Wenn es von der Oberfläche der Membran weg gebogen wird, kann ein Monomer eingebaut werden. Schwingt das nun längere Filament zurück, so kann die in der Flexion gespeicherte Energie Vortrieb erzeugen, sprich die Membran wird vorgeschoben. *In vitro* konnte solches „vibriieren“ selbst von stark verzweigten Filamenten gezeigt werden (Blanchoin *et al.*, 2000a)(Abb. 1 B).

Dicht hinter dem leading edge der Zelle wird das Actinnetzwerk umorganisiert

Nur etwa 1 μm tief reicht das stark verzweigte dendritische Actinnetzwerk in die Zelle (Svitkina and Borisy, 1999). Es schließt sich eine Zone der Umorganisation an. Auf diese folgt eine Zone die durch lange unverzweigte Filamente charakterisiert wird (Small and Celis, 1978). Oft wird dieser Bereich einer Zelle Lamellum genannt. Als Lamellipodium werden dann die beiden vorderen Zonen bezeichnet. Die Reorganisation geht innerhalb von etwa 5 sec von statten. Die Phosphat-Dissoziation von Actin und ATP Hydrolyse durch Arp2 scheint eine Voraussetzung zu sein (Blanchoin *et al.*, 2000b). Wahrscheinlich tragen beide Strukturen, Lamellum und Lamellipodium zur Fortbewegung bei. Im Einzelnen sind die Funktionen jedoch noch nicht aufgeklärt (Le Clainche and Carlier, 2008).

ADF vermittelte Depolymerisation verhindert den schnellen Verbrauch von G-Actin

Ein Mechanismus, der einer schnellen Depletion des G-Actin Pools entgegenwirkt, beruht auf der Funktion von Proteinen der ADF/cofilin Familie (vom engl. *actin depolymerising factor*). Man findet ADF fast überall im Lamellipodium, nur das *leading edge* ist ausgespart (Svitkina and Borisy, 1999).

ADF's binden zwar schwach an ATP-F-Actin und ADP-P_i-F-Actin, beschleunigen aber nur die Depolymerisation von ADP-F-Actin. Die Rolle von ATP Hydrolyse und Phosphatdissoziation als Zeitgeber wurde bereits besprochen. Kein bekanntes Protein beeinflusst die ATP-Hydrolyse, jedoch scheint ADF trotz der schwachen Bindung an ADP-P_i-F-Actin in der Lage zu sein die Phosphatdissoziation zu beschleunigen (Blanchoin and Pollard, 1999). Durch die Bindung an Actin verändert ADF die Verdrillung der Actin Doppelhelix (Maciver *et al.*, 1991) was letztlich zur Depolymerisation führt. Die an ADF gebundenen Monomere werden durch Profilin wieder in den Zyklus eingeschleust. Profilin konkurriert mit ADF um G-Actin und katalysiert den Nukleotidaustausch. Dadurch wird die Affinität von ADF zu Actin herabgesetzt und das Monomer kann erneut polymerisieren (Rosenblatt *et al.*, 1995). Die Aktivität von ADF/cofilin Proteinen wird durch Phosphorylierung gesteuert. Kinasen, wie z.B.: LIM, phosphorylieren das Serin3 am N-Terminus und deaktivieren ADF's. Dieses Phosphoserin verhindert Bindung an ADP-F-Actin und an Monomere (Blanchoin *et al.*, 2000c). In vielen Organismen entfernt eine spezialisierte Phosphatase namens *slingshot* den inhibitorischen Phosphatrest (Niwa *et al.*, 2002) und aktiviert so ADF Proteine. Zusammen erhöhen Profilin und ADF die *treadmilling* Rate um das 125fache (Didry *et al.*, 1998)(Abb. 1 A).

Proteine der WASP- Familie sind von zentraler Bedeutung für die Regulation von Actinnetzwerken

Die Bewegung von Zellen kann sowohl von internen als auch von externen Faktoren gesteuert werden. Einige Zellen bewegen sich spontan, was eine interne Regulation nahe legt. In vielen Fällen wird Lokomotion jedoch durch externe Stimuli induziert, oftmals sind daran chemotaktischen Substanzen beteiligt. *Dictyostelium* reagiert beispielsweise auf zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Leukozyten können durch bakterielle Peptide angelockt werden.

Ein zentraler regulatorischer Mechanismus scheint die Aktivierung von Proteinen der WASP-Familie zu sein. Die VCA Domäne, die Arp2/3 aktiviert, ist intrinsisch aktiv. WASP als Ganzes ist jedoch inaktiv, da es in einer autoinhibitorischen Konformation vorliegt. Eine intramolekulare Interaktion der VCA Domäne mit der sog. *GTPase binding domain* (GBD) von WASP ist der Grund hierfür. Diese Interaktion maskiert die VCA Domäne, die so weder G-Actin noch den Arp2/3 Komplex binden kann. Weitere Domänen von WASP verstärken die autoinhibitorische Konformation. Ein Abschnitt basischer Aminosäuren, die sog. *basic domain* interagiert ebenfalls intramolekular mit der VCA-Domäne (Kim *et al.*, 2000).

Um WASP zu aktivieren und Zellmigration einzuleiten heben verschiedene Signalmoleküle die autoinhibitorische Konformation auf. Sie binden an die Domänen von WASP, die im inaktiven Zustand mit der VCA Domäne interagieren. Durch diese Konkurrenz wird die VCA Domäne frei und kann Arp2/3-abhängige Polymerisation induzieren. Die beteiligten Signale sind sehr verschieden: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) beispielsweise bindet an die *basic domain*, die Rho GTPase Cdc42 interagiert mit der *GTPase binding domain* von WASP (Higgs and Pollard, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass weitere Proteine mit PIP₂ und Cdc42 kooperieren um WASP zu aktivieren. Diese binden an einen prolinreichen Abschnitt, der zwischen dem regulatorischen und dem Arp2/3-aktivierenden Bereich von WASP liegt. Profilin beispielsweise kooperiert mit Cdc42 (Yang *et*

al., 2000), Adapterproteine wie z.B.: Nck kooperieren mit PIP_2 (Rohatgi *et al.*, 2001). Neben den beschriebenen Proteinen gibt es noch weitere, die an der Regulation von WASP beteiligt sind, z.B.: das *WASP interacting protein* (WIP). Sie binden an die N-terminal gelegene *WASP homology domain 1* (WH1 = EVH1 Domäne) (Pollard, 2007). Durch Phosphorylierungen kann die Aktivität von WASP aufrechterhalten werden. Sie verhindert die Konformationsänderung zurück in den autoinhibitorischen Zustand (Torres and Rosen, 2003) - ein Beispiel für molekulares Gedächtnis. Da zur Aktivierung von WASP viele Signale zusammenlaufen, wird eine präzise Regulation gewährleistet (Abb. 1 B).

Im beschriebenen Modell der Zellmigration sind die einzelnen Filamente an beiden Enden stabilisiert. Das Actinnetzwerk als Ganzes ist hingegen in ständigem Auf- und Abbau begriffen. Aus diesem Grund wird dieses Modell auch als *array treadmilling model* bezeichnet.

De novo Nukleation durch Formine führt zur Bildung von langen unverzweigten Filamenten

Einige Organismen besitzen offenbar keinen Arp2/3 Komplex. In den Genomen von Algen, Microsporidia und Apicomplexa konnten nicht alle Homologe des Arp2/3 Komplex identifiziert werden (Gordon and Sibley, 2005; Muller *et al.*, 2005). Diese Organismen besitzen jedoch andere Proteine die zur Nukleation fähig sind: Formine. In den meisten Fällen findet man jedoch sowohl den Arp2/3 Komplex als auch Formine. Charakteristisch für Formine sind zwei Domänen, die sog. *formin homology domain 1* und 2 (FH1 bzw. FH2). Für die Nukleation von Mikrofilamenten ist die FH2 Domäne verantwortlich: Zwei FH2 Domänen interagieren und bilden ein ringförmiges Homodimer (Xu *et al.*, 2004). Dieses wiederum stabilisiert Actindimere und katalysiert so die Nukleation von F-Actin (Kovar *et al.*, 2003; Otomo *et al.*, 2005; Pruyne *et al.*, 2002) (Abb. 1 C). Die Hauptfunktion von Forminen ist neben der Nukleation aber die Katalyse der Elongation. Dazu binden FH2 Dimere die + Enden von F-Actin (Pruyne *et al.*, 2002). Offenbar können FH2 Domänen dabei zwei Konformation annehmen. Eine favorisiert den Einbau von Monomeren, die andere jedoch hemmt Elongation zum Teil bis zu 100% (Kovar *et al.*, 2006). Ist die fortschreitende Elongation durch Formine eingeleitet, können bis zu 100 Monomeren pro Sekunde eingefügt werden und dies oftmals über einen Zeitraum von mehreren Minuten. Sehr lange unverzweigte Filamente sind die Folge (Yang and Pon, 2002). Um dies zu ermöglichen interagieren FH2 und FH1 Domänen. Die FH1 Domänen sind lang und flexibel und rekrutieren Profilin/G-Actin Komplexe aus dem Cytosol. Wichtig für diese Interaktion sind kurze, prolinreiche Sequenzen der FH1 Domäne. Sie erlauben die Bindung von mehreren Profilin/G-Actin Heterodimeren pro FH1 Domäne (Chang *et al.*, 1997). Zusammen können Formin und Profilin die Elongationsrate bis zu fünfzehnfach erhöhen (Romero *et al.*, 2004). Dabei hängt der Grad der Beschleunigung von der Zahl der Profilin-Bindestellen je FH1 Domäne ab (Paul and Pollard, 2008). Ein Modell sieht den Grund für die hohen Wachstumsraten, in der Konzentration von Profilin/G-Actin Komplexen durch die FH1 Domänen in der Nähe des + Endes. Darüber hinaus beeinflusst Profilin die Konformation der FH2 Domänen. In Anwesenheit von Profilin scheint die Konformation favorisiert zu werden, die schnelle Elongation erlaubt (Le Clainche and Carlier, 2008). Wie Formine es jedoch schaffen trotz sehr schnellem Wachstum von Filamenten über ihre FH2 Domäne am + Ende gebunden zu bleiben ist noch unklar. Ebenso ist unklar wie dieser Vorgang mit Energie gespeist wird. Einiges spricht dafür, dass die Hydrolyse von ATP durch Actin daran beteiligt ist. Demnach interagiert

ein ATP-G-Actin/Profilin Komplex durch die Funktion von Formin mit dem + Ende eines Mikrofilaments. Formin beschleunigt dann ATP Hydrolyse, was die Dissoziation von Profilin und G-Actin bewirkt. Außerdem wird angenommen, dass die ATP-Hydrolyse die Translokation einer der beiden FH2 Domänen entlang des Filaments veranlasst. Dies ermöglicht dann den Einbau des nächsten G-Actin (Otomo *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2007)(Abb. 1 C).

Die Regulation von Forminen ist anders als die des Arp2/3 Komplex weniger gut verstanden. Sie scheinen in einer autoinhibitorischen Konformation vorzuliegen. Verantwortlich dafür ist die intramolekulare Interaktion der C-terminal gelegenen sog. *diaphanous autoregulatory domain* (DAD) und der N-Terminal gelegenen sog. *diaphanous inhibitory domain* (DID) (Wallar *et al.*, 2006). Sie maskieren die FH2 Domänen und verhindern Interaktion mit Actin. Ebenfalls am N-Terminus liegt bei den meisten Forminen eine *GTPase binding domain* (GBD). Ähnlich wie bei der Aktivierung von WASP (s. oben) hebt die Bindung einer Rho-GTPase die autoinhibitorische Interaktion auf (Alberts, 2001; Lammers *et al.*, 2005; Li and Higgs, 2003; Rose *et al.*, 2005).

Die zelluläre Rolle von Forminen ist vielseitig. Formine sind höchstwahrscheinlich für die Bildung von Filopodien verantwortlich. Diese enthalten, anders als Lamellipodien, 15-20 gebündelte lange Actinfilamente (Lewis and Bridgman, 1992), wie sie durch Formin geformt werden. Konsistent mit dieser Idee ist die Beobachtung, dass eine konstitutiv aktive Form von Formin die Bildung von Filopodien induziert (Wallar *et al.*, 2006). Ein Kandidat für die Regulation von Filopodien bzw. von Forminen ist die Rho-GTPase Cdc42. Injiziert man sie in Zellen, so werden Strukturen gebildet, die Filopodien ähneln. Dieser Prozess ist unabhängig von der Aktivierung oder der Anwesenheit des Arp2/3 Komplex ist (Lommel *et al.*, 2001; Nobes and Hall, 1995; Steffen *et al.*, 2006). Außerdem ist Formin für die Bildung des Kontraktilen Rings während der Cytokinese von Zellen verantwortlich (Wallar and Alberts, 2003). Formine sind darüber hinaus Antagonisten von anderen, am + Ende bindenden Proteinen. Die Konkurrenz mit CP scheint von besonderer Bedeutung für die Bildung von Filopodien zu sein, da diese Proteine gegenteilige Effekte auf das Wachstum von Filamenten haben (Faix and Rottner, 2006). Da der Arp2/3 Komplex und Formine in der Lage sind mit den gleichen Komponenten verschiedene, auf Actin basierende Strukturen zu induzieren, wird klar warum Lamellipodien und Filopodien gleichzeitig an einer Zelle beobachtet werden können (Abb. 1).

1.1.3 Pathogene nutzen die Actin-Maschinerie der Wirtszelle zur eigenen

Fortbewegung

An vielen Stellen in der Biologie ist zu sehen, dass Organismen die Fähigkeiten und Eigenschaften anderer Lebewesen zu ihrem eigenen Vorteil ausnutzen. Auch die bisher beschriebenen Mechanismen werden von pathogenen Organismen zweckentfremdet.

Einige Bakterien und mindestens ein Virus nutzen die Actin-Maschinerie der Wirtszelle zur Fortbewegung. Um dies zu ermöglichen und sich von Zelle zu Zelle bewegen zu lassen, müssen Pathogene gerichtete Actinpolymerisation initiieren. Dies erreichen sie durch molekulares Mimikry und in den meisten Fällen durch eine polare Expression der beteiligten Faktoren. Bakterielle Pathogene

die sich auf diese Weise bewegen entgehen dem Immunsystem ihrer Wirte, da sie sich verbreiten ohne der extrazellulären Umgebung exponiert zu sein.

Die Expression eines eigenen nucleation-promoting factor (NPF) ermöglicht die Nutzung des Actins der Wirtszelle.

Es ist nicht bekannt, dass Pathogene einen eigenen Actinnukleator exprimieren. Daher scheint die Expression eines eigenen *nucleation-promoting factor* (NPF) die einfachste Möglichkeit zu sein das Actin der Wirtszelle zu nutzen. Dies ist bei dem Gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes* verwirklicht. Dieser fakultativ intrazelluläre Pathogen wird über verunreinigte Nahrung verbreitet und verursacht Gastroenteritis. Listerien können aber auch systemische Infektionen etablieren, bis hin zu Meningitis (Lambrechts *et al.*, 2008). Nach dem Eintritt in die Wirtszelle exprimiert *Listeria monocytogenes* ActA, der erste beschriebene Aktivator des Arp2/3 Komplex (Kocks *et al.*, 1992; Welch *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass ActA asymmetrisch auf der Oberfläche verteilt ist (Smith *et al.*, 1995). Proteine der WASP-Familie und ActA besitzen viele strukturelle Gemeinsamkeiten und daher wird angenommen, dass ActA den Arp2/3 Komplex auf ähnliche Weise aktiviert (Skoble *et al.*, 2000; Zalevsky *et al.*, 2001). Die Aktin-Netzwerke, die *Listeria* induziert, besitzen die gleiche Architektur wie die Netzwerke in Lamellipodien und werden *comet tails* (vom engl. *comet tails* = Kometenschweif) genannt. *Listeria monocytogenes* bewegt sich auf diese Weise von Zelle zu Zelle. ActA-abhängige Lokomotion ist somit ein entscheidender Virulenzfaktor (Abb. 2 A)(Stevens *et al.*, 2006).

Auch Rickettsien, die von Arthropoden übertragenen Erreger von Fleckfieber und Typhus, exprimieren einen eigenen NPF. Vor allem bei den Fleckfieber verursachenden Arten kann Actin-basierende Bewegung beobachtet werden (Stevens *et al.*, 2006). Sie exprimieren RickA, welches Arp2/3 an die Oberfläche der Rickettsien rekrutiert und aktiviert (Gouin *et al.*, 2004; Jeng *et al.*, 2004). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass RickA in eukaryotischen Zellen Strukturen induziert, die Filopodien ähneln (Gouin *et al.*, 2004). Die ultrastrukturelle Untersuchung der *comet tails* von *Rickettsia rickettsii* zeigte unverzweigte, lange, gebündelte Filamente wie sie in Filopodien zu finden sind (Van Kirk *et al.*, 2000). Anders als ActA scheint RickA an der gesamten Oberfläche exprimiert zu sein (Gouin *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus, den Rickettsien für ihre Fortbewegung nutzen, ist noch weitgehend unklar. Ebenso unklar ist, welchen Einfluss Motilität auf die Virulenz dieser Pathogene hat.

Einige Pathogene verlassen sich auf die NPF's der Wirtszelle

Erreger, wie z.B., *Shigella* exprimieren keine eigenen NPF's, sie nutzen die NPF's der Wirtszelle. Wie *Listeria* leben auch *Shigella*-Arten fakultativ intrazellulär. Shigellen besiedeln Epithelzellen des Colons und rufen akute Gastroenteritis hervor (Stevens *et al.*, 2006). Für die Verbreitung von Zelle zu Zelle ist ein Genprodukt essentiell: IcsA, es rekrutiert und aktiviert N-WASP der Wirtszelle (Loisel *et al.*, 1999; Makino *et al.*, 1986; Suzuki *et al.*, 1998). Eine Reihe von experimentellen Daten unterstützt die Idee, dass IcsA die Aktivierung von N-WASP durch Cdc42 imitiert. Durch die Mutation von *Listeria* ActA und

Shigella IcsA konnten attenuierte Stämme generiert werden, die als Lebend-Vakzine genutzt werden könnten (Abb. 2 B)(Stevens *et al.*, 2006).

Einige pathogene *Escherichia coli* Stämme nutzen ebenfalls das Actin der Wirtszelle zur Fortbewegung. Allerdings geschieht dies ohne dass die Bakterien in die Wirtszelle eintreten. Diese Bakterien injizieren über ein Typ III Sekretionssystem das Transmembranprotein Tir, an das sie über Intimin binden. Wird der cytoplasmatische Teil von Tir phosphoryliert, so rekrutiert es das Adapterprotein Nck. Dies ist wiederum an der Aktivierung von Proteinen der WASP Familie beteiligt und setzt so Arp2/3-abhängige Actinpolymerisation in Gang (Alberts *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 2006). Es ist jedoch unklar welche Rolle Motilität für die Pathogenität von *E. coli* spielt. Andere Bakterien wie z.B.: *Salmonella* interagieren mit dem Actin-Cytoskelett um die eigene Aufnahme in die Wirtszelle zu induzieren.

Auch *Vaccinia*-Viren, Verwandte des Pockenerregers *Variola*, induzieren Bewegung, die auf Actinpolymerisation beruht. Dafür ist das virale A36R Protein verantwortlich. Dieses Membranprotein befindet sich in der äußersten von vier Membranen, die den sog. *intracellular enveloped virus* (IEV) umgeben. Phosphorylierung eines Tyrosins durch die zelluläre Kinase Src aktiviert A36R, welches dann das Adapterprotein Nck rekrutiert. Nck wiederum interagiert mit WASP um so Arp2/3-abhängige Actinpolymerisation induzieren zu können (Frischknecht *et al.*, 1999). Für *Vaccinia* ist diese Art der Bewegung jedoch nicht essentiell, denn sie können auch Mikrotubuli für anterograde Bewegung nutzen (Ploubidou and Way, 2001). Daher ist es unklar, welchen Einfluss actinabhängige Bewegung auf die Verbreitung von *Vaccinia* hat (Abb. 2 C).

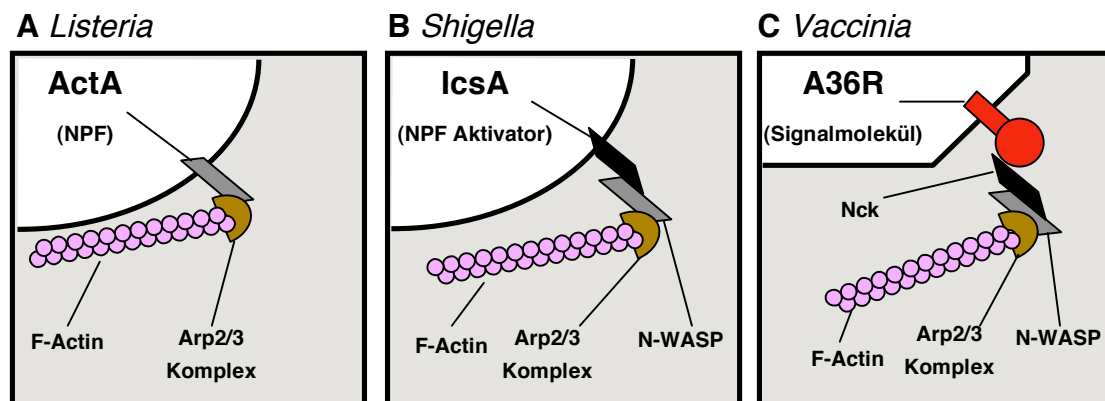


Abb. 2 Pathogene Virulenzfaktoren induzieren die lokale Actinpolymerisation in der Wirtszelle. A *Listeria* exprimiert ActA, das als NPF den Arp2/3 Komplex aktiviert. **B** *Shigella* IcsA rekrutiert und aktiviert das N-WASP der Wirtszelle. **C** *Vaccinia* Viren bilden auf ihrer Oberfläche das Proteion A36R aus, welches das N-WASP Adaptermolekül Nck rekrutiert. Das Cytosol der Wirtszelle ist in grau dargestellt, die Oberfläche der jeweiligen Pathogene in schwarz angedeutet.

Die Proteine die an der Migration von Zellen beteiligt sind und diese steuern sind mannigfaltig. Bisher sind jedoch einige Fragen zur Migration selbst, der Rolle verschiedener Pseudopodien und der Regulation von Zellbewegung unbeantwortet. Viele Einblicke konnten rekonstituierten *in vitro* Systemen erlangt werden, in denen nur wenige, definierte Faktoren mitwirken. Neben diesen stellten sich jedoch einfache *in vivo* Modelle als besonders gute Untersuchungsobjekte heraus. Ein großer Teil des Wissens über Zellmotilität stammt von Pathogen-Modellen wie *Listeria* und *Vaccinia*, da sie *in vivo*

mit wenigen Komponenten Motilität erzeugen können. Auch Protozoen der Gruppe *Apicomplexa* sind ein solches System. Deren spezielle Form der Migration soll im Folgenden besprochen werden.

1.2 *Plasmodium* Sporozoiten als Modell für Actinregulation und Zellmotilität

Apicomplexa sind wie Listerien ein gutes *in vivo* Modell zur Untersuchung von actinbasierender Zellmotilität - denn sie besitzen nur einen Bruchteil des regulatorischen Repertoires von Säugerzellen. Dazu nutzen Apicomplexa allerdings nicht das Actincytoskelett der Wirtszelle wie z.B. *Listeria*. Sie besitzen eine ganz eigene, actinabhängige Art der Lokomotion, die sog. *gliding motility* (engl. ~ gleitende Bewegung)(Morrissette and Sibley, 2002). Eine ganz erstaunliche Eigenschaft dieser Parasiten ist es trotz dieses minimalen regulatorischen Repertoires eine äußerst schnelle Bewegung im $\mu\text{m} / \text{sec}$ Bereich zu erzeugen (Vanderberg, 1974) und darüber hinaus verschiedene Arten der *gliding motility* zeigen (Morrissette and Sibley, 2002; Siden-Kiamos *et al.*, 2006b).

Apicomplexa sind die vielleicht erfolgreichsten pathogenen Mikroorganismen. Zu dieser Gruppe gehört mit *Toxoplasma gondii* ein überaus weit verbreiteter Erreger. Ihre bekanntesten und am besten untersuchten Vertreter sind aber Arten der Gattung *Plasmodium*. Traurige Berühmtheit haben diese fakultativ intrazellulär lebenden Parasiten als Erreger der Malaria erlangt; eine der drei bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Nach WHO-Schätzungen leben mehr als 40 % der Weltbevölkerung in Malaria-Endemiegebieten. Jährlich treten 300 bis 500 Millionen akute Krankheitsfälle vornehmlich in den Tropen und Subtropen auf. Von diesen verlaufen bis zu 3 Millionen tödlich. Für die Krankheit sind nur die erythrozytären Entwicklungsstadien der Plasmodien verantwortlich und die Symptomatik beruht auf der Zerstörung von Erythrozyten sowie der Freisetzung von Parasiten und erythrozytärem Material. Eine kurze Beschreibung des Lebenszyklus und der klinischen Symptomatik von Plasmodien sind dem Appendix beigefügt. Allen Plasmodien gemeinsam ist ein Wirtswechsel von Culiciden auf Vertebraten. Besonders Culiciden der Gattung *Anopheles* besitzen Vektorkompetenz. Da Plasmodien eine Vielzahl von Organismen, darunter auch Nager, infizieren, eignen sie sich als Modellorganismus. Als geeignetes Modell stellten sich die nagerpathogenen Arten *Plasmodium berghei* und *P. yoelii* heraus. *P. berghei* kommt in Zentralafrika vor und zirkuliert zwischen verschiedenen Nagern (*Grammomys surdaster*, *Praomys surdaster*, *Leggada bella*) und der Culicide *Anopheles durenii millescamps* (Lucius and Loos-Frank, 1997). Unter Laborbedingungen dienen *Mus musculus* bzw. *Rattus norvegicus* sowie *Anopheles stephensi* als Wirte und erlauben es so, den kompletten Lebenszyklus *in vivo* zu untersuchen.

Wie bereits Eingangs erwähnt bietet die Untersuchung der *gliding motility* ein relativ einfaches *in vivo* System zu Analyse von actinbasierter Motilität. Darüber hinaus könnte ein besseres Verständnis dieser einzigartigen Bewegungsform dringend benötigte neue Interventionsstrategien aufzeigen, die letztlich zur Bekämpfung von Malaria beitragen könnten. Die molekularen Grundlagen der *gliding motility* und die daran beteiligten Proteine sollen im Folgenden genauer betrachtet werden.

1.2.2 Die spezielle Lokomotion invasiver *Plasmodium* Stadien

Im Lebenszyklus von Apicomplexa im Allgemeinen und *Plasmodium* im Speziellen wechseln sich invasive Stadien und reproduktive Stadien ab (s. App. 8.1). Allen invasiven Stadien gemein ist eine längliche feste Form mit einer klaren Polarisation. An ihrem anterioren Pol ist der sog. Apicalkomplex zu finden, der Namens gebend für den ganzen Stamm ist. Kennzeichnend für diese Struktur sind sekretorische Organellen (Rhoptrien, Mikronemen und *dense granules*), die Proteine enthalten, die an der Adhäsion und Invasion von Wirtszellen beteiligt sind (Blackman and Bannister, 2001). Auch die Pellicula besitzt eine spezialisierte Organisation. Sie wird von asymmetrisch verteilten Mikrotubuli gestützt. Ihnen liegt der sog. *inner membran complex* (IMC) an; eine Struktur aus abgeflachten, membranösen Cisternae (Abb. 3). Zwischen IMC und Plasmamembran der Parasiten liegt der kortikale Raum. Dieser schmale Bereich beherbergt die molekulare Maschinerie, welche für die *gliding motility* verantwortlich ist (Morrisette and Sibley, 2002).

An dieser Form der Lokomotion sind weder Pseudopodien noch Flagellen oder Cilien beteiligt. Sie ist äußerst schnell und geht ohne sichtbare Veränderungen der Zelloberfläche einher. Eine Abhängigkeit von F-Actin und Myosin konnte jedoch gezeigt werden. Hemmstoffe von F-Actin, z.B. Cytochalasin, oder von Myosin, z.B. Butandionmonoxim, führen zu einer Inhibition der Bewegung (Dobrowolski *et al.*, 1997a; Dubremetz and Ferreira, 1978; Pinder *et al.*, 1998).

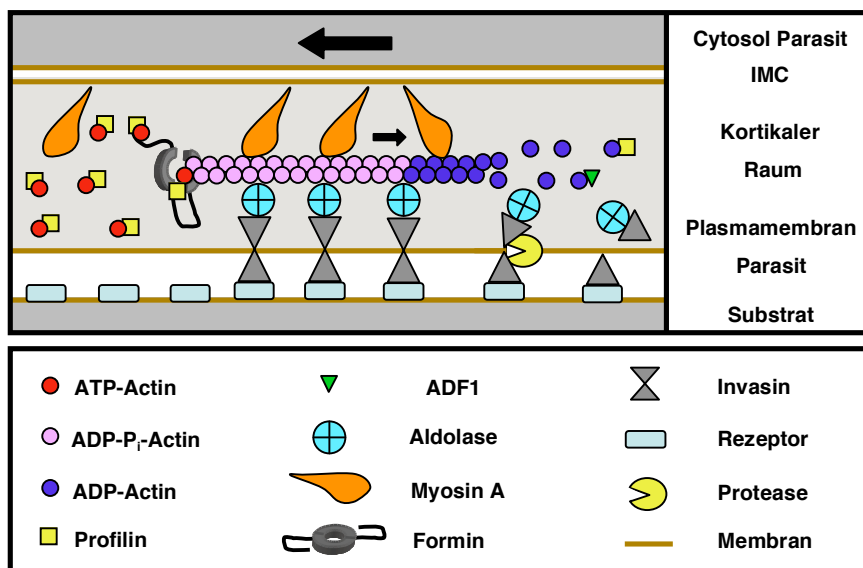


Abb. 3 Die Motormaschinerie der *gliding motility*. Oben ist ein schematischer Ausschnitt der Pellicula von motilen Stadien gezeigt. Am IMC fixiertes MyosinA ragt in den Kortikalen Raum und interagiert mit F-Actin. Proteine wie Formin und Profilin regulieren den Aufbau der Filamente; ADF1 katalysiert den Nukleotidaustausch. Interaktion des Aldolase-TRAP-Komplex mit Actin und extrazellulären Rezeptoren etabliert eine Verbindung zum Substrat. Durch MyosinA werden diese Komplexe zum posterioren Pol verschoben (kleiner Pfeil), wodurch der Parasit nach vorne geschoben wird (großer Pfeil). Rhomboid Proteasen lösen die Verbindung zum Substrat, indem sie Invasine wie TRAP spalten. Eine Legende der verwendeten Symbole ist unten gezeigt.

Der molekulare Motor der gliding motility

Im aktuellen Modell der molekularen *gliding* Maschinerie knüpfen Invasine der *thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP) Familie Kontakte mit Oberflächen (Kappe *et al.*, 1999; Sultan *et al.*, 1997). Dafür verantwortlich sind zwei adhäsive, extrazelluläre Domänen von TRAP die der A-Domäne des

von Willebrand Faktors und *thrombospondin typ 1 repeats* ähneln (Matuschewski *et al.*, 2002a). An der cytosolischen Seite ist TRAP über ein Tetramer aus Aldolase mit F-Actin verbunden (Buscaglia *et al.*, 2003; Jewett and Sibley, 2003). Möglicherweise sind Formine für die Nukleation von F-Actin verantwortlich (Baum *et al.*, 2008); Proteine wie ADF1 und Profilin recyceln G-Actin (Schuler and Matuschewski, 2006). Wie im Sarkomer von Muskelzellen, werden Actinfilamente durch die Interaktion mit Myosin verschoben. Anders als im Sarkomer ist jedoch das Myosin fixiert und bewegt sich nicht relativ zur migrierenden Zelle; es ist am IMC immobilisiert. Auf diese Weise werden F-Actin-Aldolase-TRAP-Komplexe zum posterioren Pol verschoben und der Parasit als Ganzes bewegt sich vorwärts. Am hinteren Ende wird die Verbindung zum Substrat durch die proteolytische Spaltung von TRAP gekappt; Rhomboid-Proteasen übernehmen diese Funktion (Dowse and Soldati, 2004). Auf diese Weise können sich Parasiten aus eigener Kraft bewegen sowie in Wirtszellen eindringen (Abb. 3).

Actin aus Apicomplexa polymerisiert nur ungern

Plasmodium Actin ist zu etwa 83 % identisch mit dem Actin von Hefe oder dem von Vertebraten (Wesseling *et al.*, 1988). Die Actin-Konzentration im Cytosol von *Plasmodium* und *Toxoplasma* wird auf etwa 8-10 μM geschätzt, wobei angenommen wird, dass fast das gesamte Actin in der monomeren Form vorliegt (Dobrowolski *et al.*, 1997b; Field *et al.*, 1993). Obwohl F-Actin von zentraler Bedeutung für die *gliding motility* ist (Dobrowolski and Sibley, 1996; Miller *et al.*, 1979) konnten Mikrofilamente unter physiologischen Bedingungen weder elektronenmikroskopisch noch mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern sichtbar gemacht werden (Bannister and Mitchell, 1995; Cintra and De Souza, 1985; Gantt *et al.*, 2000). Erst durch den Einsatz von F-Actin stabilisierenden Substanzen wie Jasplakinolid, kann die Polymerisation abnormer Filamente induziert werden, was zu einer artifiziellen Ausstülpung am apikalen Pol der Parasiten führt. Mit Jasplakinolid behandelte *Toxoplasma* Tachyzoiten und *Plasmodium* Merozoiten waren nicht mehr in der Lage sich normal zu bewegen bzw. normale Infektionen hervorzurufen (Mizuno *et al.*, 2002; Poupel and Tardieux, 1999; Schatten *et al.*, 2003; Shaw and Tilney, 1999; Wetzel *et al.*, 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Jasplakinolid die Endozytose von *P. falciparum* Blutstadien inhibiert (Smythe *et al.*, 2008). *P. falciparum* exprimiert zwei konventionelle Actin Isoformen (Gardner *et al.*, 2002; Wesseling *et al.*, 1989); andere Apicomplexa aber nur eine. Die beiden Actinisoformen sind unterschiedlich exprimiert. Während Actin1 (PFL2215w) in allen Stadien zu finden ist, scheint Actin2 (PF14_0124) nur in Gametocyten exprimiert (Wesseling *et al.*, 1989). Rekombinantes *P. falciparum* Actin1 polymerisiert alleine nur sehr ineffizient, obwohl die Actinkonzentration bei diesen Versuchen mit 4 μM etwa 20fach höher lag als die Kritische Konzentration konventioneller Actine. Erst durch die Zugabe von F-Actin stabilisierendem Phalloidin, dem Gift des Grünen Knollenblätter Pilzes (*Amanita phalloides*) und dem *capping*-Protein Gelsolin, konnte die Polymerisation verbessert werden. Auf diese Weise konnten mit Hilfe von fluoreszierenden Phalloidinderivaten sehr kurze Filamente sichtbar machen (Schuler *et al.*, 2005a). Auch aus *P. falciparum* Merozoiten aufgereinigtes und stabilisiertes F-Actin ist sehr kurz. Die durchschnittliche Länge dieser Filamente beträgt nur etwa 0,1 μm , was ungefähr 50 Protomeren entspricht (Schmitz *et al.*, 2005). Auch rekombinantes *Toxoplasma* Actin bildet nur kurze Polymere, obwohl hier die Kritische Konzentration etwa 3-4fach niedriger ist als die von konventionellem Actin;

eine Kopolymerisation von *Toxoplasma* und konventionellem Actin war nicht möglich (Sahoo *et al.*, 2006). Das bisher *in vivo* keine Filamente beobachtet werden konnten, liegt möglicherweise daran, dass sie nur transient vorhanden sind. Wie die Polymerisation der benötigten Filamente induziert wird und wie deren Regulation bewältigt werden könnte soll nun diskutiert werden.

Actin regulatorische Proteine in Apicomplexa

Wie bereits erwähnt konnten im Genom *Plasmodium* nur sehr wenige actinbindende bzw. regulatorische Proteine identifiziert werden. Ganze Proteinfamilien, die in anderen Eukaryoten Actin regulieren, fehlen. So konnten weder Arp 2 und 3 noch NPF's gefunden werden. Darüber hinaus fehlen vernetzende Proteine (z.B. Fimbrin, Filamin); Proteine, die am - Ende binden (z.B. Tropomoduline) und regulatorische Proteine wie VASP. Oft sind die gefundenen Orthologe nur wenig konserviert (Gardner *et al.*, 2002)(Gordon and Sibley, 2005). Auch die Zahl der sog. *actin related protein* (Gordon and Sibley, 2005) und die Zahl der actinbindenden Proteine variiert. *Toxoplasma* beispielsweise besitzt als einziger Vertreter der Apicomplexa Toxofilin; ein G-Actin sequestrierendes Protein, welches darüber hinaus an ein Ende von Filamenten bindet und so Depolymerisation hemmt (Poupel *et al.*, 2000).

Als Vertreter von G-Actin bindenden Proteinen wurden im Genom von *P. falciparum* zwei ADF's gefunden: ADF1 (PFE0165w) und ADF2 (PF13_0326); sowie ein Profilin (PFI1565w). Bisher wurde nur *Plasmodium* ADF1 eingehender untersucht und es scheint als würde es nicht die üblichen ADF-Funktionen erfüllen. Dieses, für *Plasmodium* essentielle Protein bindet zwar an G-Actin und besitzt eine höhere Affinität für ADP gebundene Monomere allerdings bindet es nicht an F-Actin. In Übereinstimmung damit, fehlen in der *Plasmodium* ADF1 Sequenz auch die Domänen, die an der Interaktion mit F-Actin beteiligt sind. Diese Domänen fehlen auch ADF's anderer Apicomplexa, wie z.B.: *Cryptosporidium* und *Toxoplasma* (Lappalainen *et al.*, 1997; Schuler *et al.*, 2005b). Darüber hinaus ist *Plasmodium* ADF1 in der Lage den Nukleotidaustausch von ADP zu ATP zu katalysieren - ein Vorgang, der normalerweise durch ADF's gehemmt wird. Zusammen genommen erinnert die *Plasmodium* ADF1 Funktionen eher an die eines typischen Profilins (Schuler *et al.*, 2005b). Die Funktionen von *Plasmodium* ADF2 sind noch weitgehend ungeklärt. Es besitzt die F-Actin bindende Domäne (Schuler *et al.*, 2005b), scheint jedoch nicht essentiell für den Parasiten zu sein. Eine *P. berghei* Mutante, der ADF2 fehlt, konnte den kompletten Lebenszyklus durchlaufen (unveröffentlichte Daten, Kai Matuschewski). Da *Plasmodium* Actin intrinsisch sehr instabil ist, kann möglicherweise auf eine Depolymerisation durch ADF's verzichtet werden. Das ADF's in *Plasmodium* eine ungewöhnliche Rolle spielen, zeigt sich auch daran, dass ADF nicht wie üblich durch die Kinase (LIM und TES) und Phosphatase (*slingshot*) reguliert werden (Schuler and Matuschewski, 2006). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass der regulatorische Mechanismus ähnlich ist. Mit dem sog. 14-3-3 Protein wurde ein Interaktionspartner gefunden, welcher inaktives, phosphoryliertes ADF stabilisiert (Gohla and Bokoch, 2002). Ein Kandidat, der die aktivierende Funktion der *slingshot* Phosphatase übernehmen könnte, wurde in *Plasmodium* gefunden. Es ist eine Phosphatase die Ähnlichkeiten mit Chronophin hat, für das gezeigt werden konnte, dass es ADF dephosphoryliert (Gohla *et al.*, 2005).

Apicomplexa exprimieren eine Isoform von Profilin. Für *Toxoplasma* Profilin könnte eine essentielle Funktion gezeigt werden. Nach konditioneller Depletion war zwar das intrazelluläre Wachstum nicht beeinträchtigt, jedoch waren diese Parasiten *in vitro* nicht mehr infektiös verloren auch *in vivo* Virulenz in Mäusen. Biochemisch wurde gezeigt, dass Profilin verschiedener Apicomplexa ähnliche Eigenschaften besitzt wie konventionelle Profiline. Zwar komplementieren sich Profiline verschiedener Apicomplexa, in Hefe konnte *Toxoplasma* Profilin jedoch nicht die Depletion des endogenen Profilins komplementieren (Plattner *et al.*, 2008). Apicomplexa Profilin ist darüber hinaus wichtig für die Immunantwort des Wirts. *Toxoplasma* Profilin aktiviert beispielsweise den sog. *toll like receptor* 11 in Mäusen, was letztlich zur Kontrolle der *Toxoplasma* Infektion führt (Plattner *et al.*, 2008; Yarovinsky and Sher, 2006).

Neben Genen für ADF und Profilin wurde ein weiteres Gen identifiziert, dessen Genprodukt an der Regulierung von Actin in *Plasmodium* beteiligt sein könnte. Die Sequenz dieses Gens zeigt Ähnlichkeiten mit der C-terminalen Domäne des sog. *adenylate cyclase-associated protein* (CAP)(PFA0260c), mit der konventionelles CAP ADP-G-Actin bindet (Mattila *et al.*, 2004). Welche Funktion das sog. CAP like Protein in *Plasmodium* hat, kann jedoch noch nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Von den bisher beschriebenen Proteinen, die Nukleation von F-Actin bewirken konnten nur Formine bei Apicomplexa ausgemacht werden. *Plasmodium* besitzt zwei, *Toxoplasma* drei Kopien im Genom. Dabei handelt es sich um Sequenzen die eine FH2 Domäne enthalten. Typische FH1 Domänen wurden nicht aufgefunden. Einige Sequenzbereiche könnten rudimentäre FH1 Domänen darstellen (Baum *et al.*, 2008; Schuler and Matuschewski, 2006). Auch die *diaphanous autoregulatory domain* (DAD) und die *GTPase binding domain* (GBD) wurden nicht gefunden. Die trotz der fehlenden Domänen sehr großen *Plasmodium* Formine wurden jüngst genauer charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Formin1 (PFE1545c) besonders stark am Ende des Blutstadienzyklus exprimiert wird, während Formin2 (PFL0925w) 24h nach der Invasion den Höhepunkt der Expression erreicht. Formin2 besitzt eine cytosolische Lokalisierung, wohingegen Formin1 am Zellapex freier Merozoiten zu finden ist. Während der Erythrozyteninvasion lokalisiert Formin1 an der sog. *moving junction*; also der Verbindung von Parasit und Wirtszelle, wo wahrscheinlich die Kräfte generiert werden müssen, die zu Invasion führen. Die Untersuchung des Formin1 Homolog in *Toxoplasma*, ergab ähnliche Ergebnisse. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass rekombinantes *P. falciparum* Formin1 und in geringerem Maße auch Formin2 *in vitro* zur Nukleation und Elongation von F-Actin fähig sind. Eine Depletion von Formin1 scheiterte, was eine essentielle Funktion in Blutstadien nahe legt (Baum *et al.*, 2008).

Wie bereits erwähnt fehlt *Plasmodium* der Arp2/3 Komplex, allerdings wurden neun andere Sequenzen identifiziert, die der von Actin ähneln. Diese wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Arp's und sog. *actin like proteins* (ALP). Arp's sind Proteine, die je nach Sequenzhomologie zu Actin eingeteilt werden, wobei Arp1 den höchsten Grad der Ähnlichkeit zu Actin hat. Eindeutige Homologe zu Arp's anderer Organismen werden auch in Apicomplexa Arp genannt; nur in Apicomplexa gefundene Actin ähnliche Proteine nennt man ALP. Die Funktionen vieler dieser ALP's ist noch weitgehend unbekannt

(Gordon and Sibley, 2005). Wahrscheinlich sind einige an der Regulation der Actindynamik beteiligt. Eine aktuelle Studie beschäftigt sich mit der Funktion von *Toxoplasma* ALP1. Dieses hoch konservierte Protein findet sich nur in Apicomplexa. In *Toxoplasma* scheint es an der Formation der IMC's der Tochterzellen während der speziellen Form der Zellteilung, der sog. Endodyogenie beteiligt zu sein (Gordon *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde auch ein Homolog von Arp1 (PFA0190c) gefunden; ein essentieller Bestandteil des Dynactin Komplex (s. unten). Auch Homologe von Arp4 und Arp6 wurden gefunden - Proteine die in anderen Organismen an der Regulation von Chromatin beteiligt sind (Kato *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2003).

Bislang noch nicht erwähnte F-Actin bindende Proteine sind Coronine und sie besitzen eine sog. WD40 Domäne. Diese Domänen finden sich in einer großen Zahl von Proteinen mit mannigfaltigen Funktionen, wobei den WD40 Domänen eine Funktion als Gerüst für den Aufbau von Proteinkomplexen zukommt. In anderen Organismen sind Coronine an der Regulation und Bündelung von F-Actin sowie an der Vernetzung von Actinfilamenten und Mikrotubuli beteiligt (Rybakin and Clemen, 2005). Coronin inhibiert darüber hinaus die Aktivierung des Arp2/3 Komplex (Pollard, 2007). In *P. falciparum* wurde ein Gen für Coronin identifiziert (PFL2460w) und es konnte gezeigt werden, dass es mit F-Actin interagiert (Tardieux *et al.*, 1998b). In der Gensequenz des *Plasmodium* Coronins fehlt jedoch die Domäne, die für die Interaktion mit Mikrotubuli verantwortlich ist (Schuler and Matuschewski, 2006).

Darüber hinaus finden sich im Genom von *P. falciparum* sechs unkonventionelle Myosine, die alle in der Apicomplexa-spezifischen Klasse XIV zusammengefasst werden (Heintzelman and Schwartzman, 1997; Meissner *et al.*, 2002). Sie bestehen nur aus einem Kopf und sehr kurzem Schwanz. Abgesehen von Myosin A (MyoA) sind ihre Funktionen relativ unbekannt (PF13_0233). Wie bereits oben erwähnt ist MyoA höchstwahrscheinlich der Motor, der die *gliding motility* ermöglicht. *P. falciparum* MyoA ist an der Peripherie von invasiven Stadien lokalisiert (Matuschewski *et al.*, 2001; Pinder *et al.*, 1998) und wird durch einen Interaktionspartner, *myosin A tail interacting protein* (MTIP)(PFL2225w) an den IMC gebunden (Bergman *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2006). Ob Myosine neben ihrer Funktion als Motorprotein auch an der Regulation von Actin beteiligt sind ist ungeklärt (Schuler and Matuschewski, 2006).

Einige jüngere Studien zeigen, dass sog. *calcium dependent protein kinases* (CDPK) eine wichtige Rolle für die *gliding motility* spielen. Eine Depletion von CDPK3 in *P. berghei* führte zu einer Herabsetzung der Motilität der Ookineten. Diese Parasiten waren nicht in der Lage den Mitteldarm von *Anopheles* Moskitos in großer Zahl zu penetrieren. Da die anderen invasiven Stadien nicht durch die Depletion von CDPK3 beeinträchtigt waren, kann vermutet werden, dass CDPK3 spezifisch für die Regulation der Ookinetenmotilität ist (Ishino *et al.*, 2006; Siden-Kiamos *et al.*, 2006a). Für CDPK1 von *P. falciparum* konnte kürzlich eine essentielle Funktion für die Entwicklung erythrozytärer Stadien gezeigt werden. Sie ist sowohl in Blutstadien als auch in Sporozoiten exprimiert. Wurden Parasiten mit Purinderivaten behandelt, die *in vitro* CDPK1 inhibierten, so stoppte deren Blutstadienentwicklung an Ende der erythrozytären Schizogonie (Kato *et al.*, 2008). Ob CDPK's die Verbindung von extrazellulärem Stimulus und Actinregulation sind muss noch geklärt werden.

Neben den bereits erwähnten Proteinen finden sich im Genom von *Plasmodium* zwei weitere Gene, deren Genprodukte mit großer Wahrscheinlichkeit an der Regulation von Actin beteiligt sind. Diese Gene kodieren für die beiden Untereinheiten des bereits erwähnten *capping proteins* (CP). Da *Plasmodium* Actin intrinsisch sehr instabil ist, ist die Funktion dieser Proteine wahrscheinlich von besonderer Bedeutung für den Parasiten. Im folgenden Abschnitt sollen daher die Funktionen und Eigenschaften von CP genauer betrachtet werden.

1.3 Das *capping* Protein

1.3.1 Vorkommen, Eigenschaften und Struktur

Das ubiquitär vorkommende *capping* Protein (CP) ein essentieller Bestandteil des Actincytoskeletts. CP wurde in allen untersuchten eukaryotischen Organismen und in allen Zelltypen der Metazoa, inklusive *Plasmodium* gefunden (Cooper and Sept, 2008; Schuler and Matuschewski, 2006). Es wurde bereits in den 1960ern unter den Namen β -actinin aus Muskelgewebe aufgereinigt und charakterisiert (Maruyama and Obinata, 1965; Maruyama, 2002). Isenberg *et al.* konnten 1980 erstmals nicht muskuläres CP aus *Acantanmoeba* aufreinigen und die Bindung an das + Ende von Actinfilamenten zeigen, was auch zur Benennung führte (Isenberg *et al.*, 1980).

CP ist ein α/β Heterodimer, wobei die Masse der α Untereinheit in der Regel zwischen 32 und 36 kDa liegt; die der β Untereinheit zwischen 28 und 32 kDa. Sie bilden zusammen ein sehr stabiles Protein bilden, welches bei 58 °C schmilzt (Sizonenko *et al.*, 1996). Einzeln wurden sowohl α als auch β Untereinheit als instabil beschrieben (Wear and Cooper, 2004); rekombinante Expression von CP gelang erstmals 1998 als beide Untereinheiten in einen Vektor kloniert und simultan exprimiert wurden (Soeno *et al.*, 1998). Ein einzelnes Molekül CP genügt um an das + Ende eines Actinfilaments zu binden und sowohl Einbau als auch Verlust von Actinmonomeren am + Ende zu verhindern (Bearer, 1991; Kim *et al.*, 2007); die Affinität von CP für das + Ende liegt im subnanomolaren Bereich (Wear *et al.*, 2003). In Zellen ist die Konzentration von CP mit der Zahl an + Enden vergleichbar, sie liegt im unteren μM Bereich (Cooper *et al.*, 1984). Da die kritische Konzentration für spontane Actinpolymerisation am + Ende niedriger ist als am - Ende, erhöht gebundenes CP die kritische Konzentration. Wie bereits oben erwähnt ist CP eines der Proteine, die benötigt werden um *in vitro* actinbasierende Motilität zu erzeugen (Loisel *et al.*, 1999).

Invertebraten haben je einzelne Gene, die für α und β Untereinheit kodieren. Vertebraten exprimieren pro Untereinheit zwei Isoformen in somatischen Zellen. Eine weitere Isoform von α und β Untereinheit findet sich in männlichen Keimzellen (Hart *et al.*, 1997b; Hurst *et al.*, 1998; Schafer *et al.*, 1994b; von Bulow *et al.*, 1997). Die somatischen α Isoform - $\alpha 1$ und $\alpha 2$ - werden von zwei Genen kodiert (Hart *et al.*, 1997a), die beiden β Isoformen werden durch alternatives Spleißen produziert (Schafer *et al.*, 1994b). Die jeweiligen Isoformen sind konserviert in Vertebraten, was eine spezifische Funktion nahe legt. Die spezifische Funktionen von $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sind nicht bekannt, sie werden aber in verschiedenen Verhältnissen in verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert (Hart *et al.*, 1997b). $\beta 1$ ist spezifisch an der Z-Scheibe im Sarkomer von Quergestreifter Muskulatur zu finden (s. unten); $\beta 2$

findet sich auch in Zellen Quergestreifter Muskulatur, ist aber nicht an der Z-Scheibe lokalisiert (Schafer *et al.*, 1994b). Da $\beta 1$ und $\beta 2$ sich im Muskel nicht komplementieren, ist anzunehmen, dass sie verschiedene Funktionen wahrnehmen (Hart and Cooper, 1999). Die biochemische Natur der funktionellen Differenz ist unklar, da *in vitro* verschiedene Isoformen ähnlich gut an Actin binden (Pappas *et al.*, 2008; Schafer *et al.*, 1994b).

Obwohl die Aminosäuresequenz beider Untereinheiten nahezu keine Ähnlichkeiten aufweist, ist die Sekundärstruktur erstaunlich ähnlich. Die Kristallstruktur zeigt zwei Symmetrieachsen im α/β Heterodimer (Yamashita *et al.*, 2003)(Abb. 4). Vergleicht man die Untereinheiten verschiedener Organismen, so fällt auf, dass die Sequenzhomologie der β Untereinheit größer ist als die der α (Cooper and Sept, 2008). Konservierte und variable Regionen sind in einer komplementären Art und Weise auf beiden Untereinheiten verteilt. Bei der β Untereinheit zeigt der C-Terminus die größte Sequenzvariabilität; bei der α Untereinheit hingegen, ist der C-Terminus stärker konserviert als der Rest der Untereinheit. Dies hat zur Folge, dass die rechte Hälfte des Proteins (β Untereinheit + α C-Terminus) stärker konserviert ist als die linke Hälfte (α Untereinheit + β C-Terminus). Der Grund für diese inhärente Asymmetrie scheint in der Art der Bindung an F-Actin zu liegen (Cooper and Sept, 2008)(s. unten).

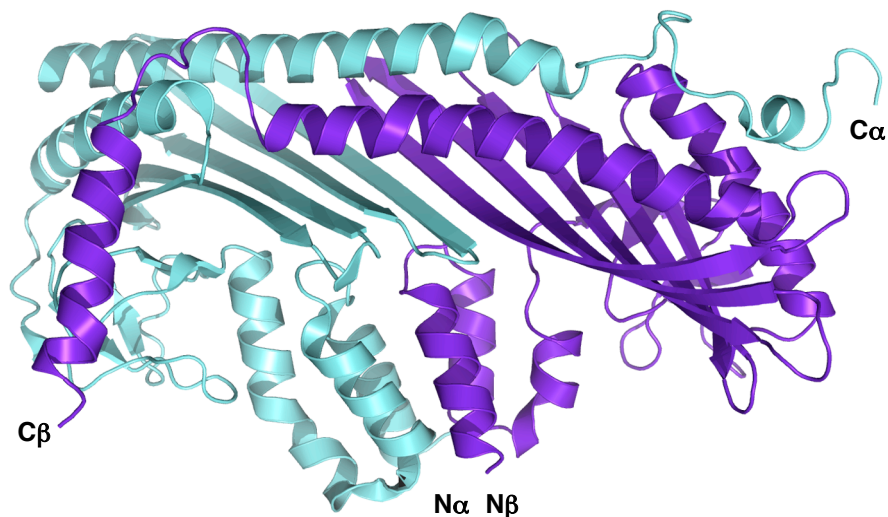


Abb. 4. Kristallstruktur von CapZ aus Hühnermuskulatur. In hellblau ist die α Untereinheit gezeigt; in dunkelblau die β Untereinheit. Für die Formation des Heterodimers sind vor allem hydrophobe Aminosäuren der zentralen β -Faltblätter, der α -Helices am N-Terminus sowie der α -Helices im oberen Teil des Dimers verantwortlich. Die Positionen der C- und N-Termini sind gekennzeichnet (verändert nach Yamashita *et al.*, 2003; zur Verfügung gestellt von Herwig Schüler).

Der C-Terminus beider Untereinheiten besitzt amphipatischen Charakter. Mutation oder Verlust des jeweiligen C-Terminus vermindert die Affinität zu F-Actin drastisch. Dabei ist der α C-Terminus für die Bindung wichtiger ist als der β C-Terminus, was den höheren Grad an Sequenzhomologie zwischen verschiedenen Organismen erklären könnte. CP mit nur einem C-Terminus (α oder β) besitzt noch *capping*-Aktivität. Mit geringer Affinität ist auch der β C-Terminus alleine in der Lage ein Filament am + Ende zu stabilisieren (Wear *et al.*, 2003). Tryptophan271 des CP α C-Terminus besetzt eine hydrophobe Tasche auf der Oberfläche von CP β und fixiert so den CP α

C-Terminus (Yamashita *et al.*, 2003). Mutation des Tryptophan²⁷¹ Analog in Hefe CP führt zu einer drastischen Herabsetzung der *capping*-Aktivität (Kim *et al.*, 2004). Der CP β C-Terminus ist hingegen sehr beweglich (Bhattacharya *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2003). Diese Eigenschaften der jeweiligen C-Termini spielen eine Rolle bei der Bindung an Actin.

1.3.2 CP stabilisiert das + Ende von Actinfilamenten

Wie CP an das + Ende von Actinfilamenten bindet wurde in, zum Teil kontroversen, Modellen beschrieben (Wear *et al.*, 2003). Neuere Cryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten beide Untereinheiten identifizieren und deren relative Position zu Actinprotomeren zeigen (Narita *et al.*, 2006; Narita and Maeda, 2007). *In silico* Modellierungen zeigten, dass der flexible, amphipatische β C-Terminus in eine hydrophobe Vertiefung des letzten Actinprotomers binden kann (Dominguez, 2004; Hertzog *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse ergaben ein neues Modell der Bindung von CP an filamentösem Actin. Demnach bildet der konservierte Teil von CP (β Untereinheit + α C-Terminus) primäre Kontakte mit mindestens zwei Protomeren des Filaments. Dabei interagieren wahrscheinlich basische Aminosäuren des α C-Terminus mit sauren Aminosäuren am Filamentende, die vom letzten und vorletzten Protomer des Filaments stammen. Im zweiten Schritt bindet der flexible CP β C-Terminus in die hydrophobe Tasche des letzten Protomers (Narita *et al.*, 2006; Narita and Maeda, 2007) (Abb. 5).

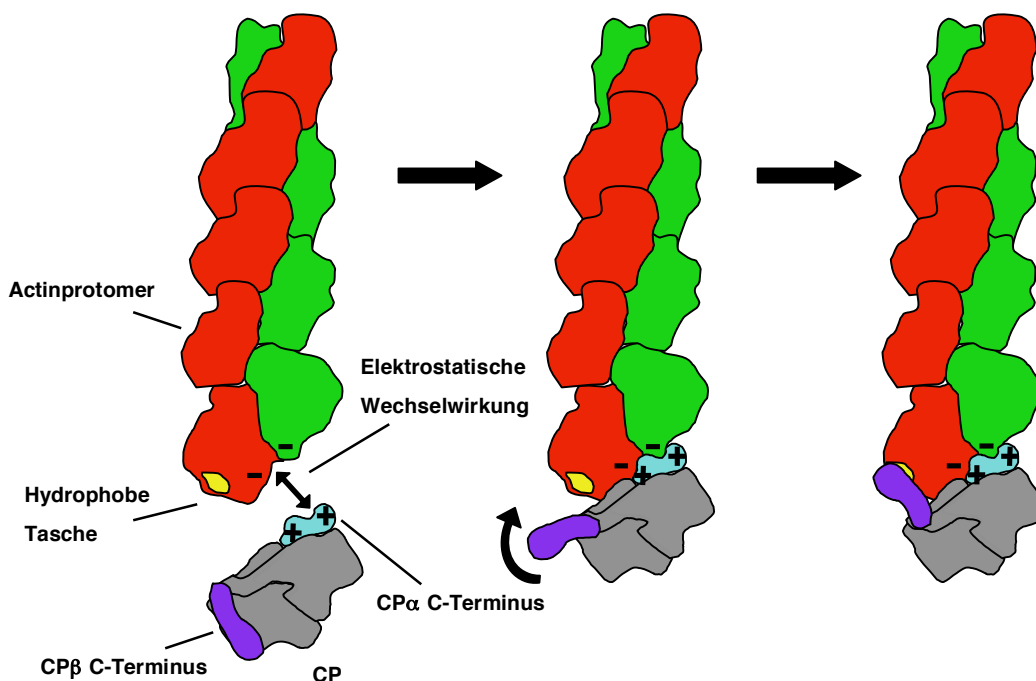


Abb. 5 Modell der CP-Bindung an F-Actin. Im ersten Schritt der Bindung führen elektrostatische Wechselwirkungen zu einer Interaktion des CP α C-Terminus mit den letzten beiden Protomeren des Filaments. Im zweiten Schritt interagiert der amphipatische CP β C-Terminus mit einer hydrophoben Tasche des letzten Actinprotomers. Die Actinprotomere des doppelhelikalen Filaments sind in rot bzw. in grün dargestellt. Verändert nach Narita *et al.*, 2006.

Dieses Modell eröffnet die Möglichkeit, dass die Dissoziation von CP, das sog. *uncapping*, in umgekehrter Reihenfolge, vom α C Terminus her beginnen könnte. Für einen Übergangszustand könnte CP nur mit den β C-Terminus gebunden. Die hohe Flexibilität des β C-Terminus könnte CP erlauben einen sog. *wobble*-Status einzunehmen (engl. *to wobble*: taumeln), d.h. das CP das + Ende des F-Actins teilweise freigibt und anschließend wieder bindet. In einem solchen *wobble*-Zustand könnten andere Proteine an CP binden und beispielsweise eine erneute Bindung inhibieren und so komplette Dissoziation favorisieren. Das *uncapping* könnte ein wichtiger zellulärer Mechanismus zur Um- und Neuorientierung von Mikrofilamenten sein (Cooper and Sept, 2008). Einige Untersuchungen von CP Inhibitoren unterstützen einen hypothetischen *wobble*-Zustand beim *uncapping* (s. unten).

1.3.3 Regulation von CP

Direkte Regulation von CP

Für verschiedene Proteine konnte gezeigt werden, dass sie an CP binden, es inhibieren und zum Teil eine *uncapping*-Aktivität besitzen. Ein solches Protein ist CARMIL (vom engl. *capping protein*, *Arp2/3*, and *myosin I linker*), welches in *Dictyostelium* zuerst beschrieben wurde aber auch in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, Mäusen und Menschen zu finden ist (Jung *et al.*, 2001). In *Dictyostelium* ist CARMIL am vorderen Ende von migrierenden Zellen und in endocytotischen Zellextensionen zu finden. Depletion von CARMIL in *Dictyostelium* reduziert die Effizienz von chemotaktischer Aggregation und reduzierten Pinocytoseraten (Jung *et al.*, 2001). CARMIL inhibiert CP und ist in der Lage bereits gebundenes CP vom Filament zu entfernen. Dies ist CP-spezifisch. Andere Proteine (z.B.: Gelsolin) werden nicht durch CARMIL inhibiert oder vom + Ende des Filaments entfernt. Am C-Terminus liegt der Bereich, der für die CP-Inhibition verantwortlich ist. Dieser, in vielen Organismen konservierte Teil, wird als *CARMIL homology domain 3* (CAH3) bezeichnet. Sie alleine bindet CP etwa 20fach besser als CARMIL und ist etwa 10fach aktiver. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass CARMIL autoinhibitorische Eigenschaften besitzt (Urano *et al.*, 2006). CARMIL ist außerdem in der Lage *Arp2/3* zu aktivieren. Die dafür benötigten Konzentrationen liegen allerdings signifikant höher als die anderer NPF's wie z.B. WASP. Die Titration von CP durch CARMIL führt jedoch nicht zu einer kompletten Inhibition der *capping*-Aktivität (Yang *et al.*, 2005), was mit einer Bindung von CARMIL an CP im hypothetischen *wobble*-Zustand erklärt werden könnte. Die Bindung von CARMIL an CP würde erfolgen wenn es nur über den β C-Terminus mit dem Filament verbunden ist und könnte so dessen Dissoziation bewirken. Auch die unvollständige Inhibition ließe sich so erklären. Der CARMIL/CP Komplex könnte demnach nur über den β C-Terminus und nur im *wobble*-Zustand binden was sehr geringe *capping*-Aktivität und geringe Affinität zur Folge hätte. Die Vielzahl biochemischer Eigenschaften erlauben es CARMIL ein weites Spektrum zellulärer Funktionen zu erfüllen. Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht aufgeklärt.

V-1/myotrophin ist ein weiterer CP Inhibitor. Im Gegensatz zu CARMIL kann V-1/myotrophin nicht an F-Actin gebundenes CP binden und besitzt keine *uncapping*-Aktivität. In hohen Konzentrationen inhibiert V-1 die *capping*-Aktivität allerdings ganz. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der β C-Terminus für die V-1/myotrophin Bindung besonders wichtig ist (Bhattacharya *et*

al., 2006). Diese Ergebnisse unterstützen die *wobble*-Hypothese: da der β C-Terminus bei normaler Bindung und im *wobble*-Zustand besetzt ist, besitzt V-1/myotrophin keine *uncapping*-Aktivität (Cooper and Sept, 2008).

Ein anderer wichtiger CP Inhibitor ist Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). Es inhibiert sowohl *capping* (Heiss and Cooper, 1991) und hat darüber hinaus eine *uncapping*-Aktivität (Kim *et al.*, 2007). Nicht wachsende, da CP-gebundene Filamente, konvertieren zu wachsenden Filamenten nach der Zugabe von PIP₂. Wahrscheinlich bindet es an drei konservierte basische Aminosäuren auf der Oberfläche von CP in der Nähe des α C-Terminus. Mutation dieser, verringert sowohl die Affinität von PIP₂ zu CP als auch die *capping*-Aktivität von CP. Dieser Sequenzabschnitt ist in einer Vielzahl von Organismen, inklusive *Plasmodium*, konserviert (Kim *et al.*, 2007; Narita *et al.*, 2006). Cryoelektronenmikroskopische Aufnahmen legen die Vermutung nahe, dass die PIP₂- und die Actinbindestelle von CP überlappen (Narita *et al.*, 2006), was die Inhibition und den *uncapping*-Effekt erklären könnte. Polyphosphoinositide spielen auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Blutplättchen. Zuvor an F-Actin gebundenes CP wird durch deren *uncapping*-Aktivität entlassen was Polymerisation von Mikrofilamenten ermöglicht (Barkalow *et al.*, 1996).

Auch die Phosphorylierung der α Untereinheit (an Serin9) durch die *casein kinase 2* (CK2) könnte ein regulatorischer Mechanismus sein. Für diese Interaktion wird das *casein kinase interacting protein 1* (CKIP-1) benötigt. CKIP-1 bindet sowohl CP als auch CK-2. Der gebundene CK-2/CKIP-1 Komplex inhibiert außerdem die *capping*-Aktivität von CP. Wird CKIP-1 überexprimiert, erhöht sich der F-Actin Anteil in humanen Zellen, was zu einer Veränderung der Zellmorphologie und des Actincytoskeletts führt (Canton *et al.*, 2005). Die genaue Funktion der Phosphorylierung von CP α ist noch nicht geklärt, ebenso wie die inhibitorische Funktion des CK-2/CKIP-1 Komplexes.

Bei der Untersuchung von immunologischen Synapsen, über die aktivierte Dendritische Zellen mit naiven T-Zellen kommunizieren, wurde ein weiterer CP Inhibitor gefunden. An der Bildung dieser Zell-Zell-Interaktion sind viele Proteine beteiligt. Unter anderem wird das Transmembranprotein CD2 (vom eng. *cluster of differentiation 2*) rekrutiert, worauf eine Umorganisation des Actincytoskeletts erfolgt. Dafür ist die Interaktion des cytoplasmatischen Teils von CD2 mit dem *CD2 associated protein* (CD2AP) verantwortlich, welches seinerseits CP inhibiert (Bruck *et al.*, 2006; Dustin *et al.*, 1998; Hutchings *et al.*, 2003). Der C-terminale Teil von CD2AP ist an der CP-Bindung und -Inhibition beteiligt, während eine SH3-Domäne im N-Terminus an den prolinreichen, cytoplasmatischen Teil von CD2 bindet (Hutchings *et al.*, 2003). CD2AP stellt somit eine Verbindung von Membranrezeptoren zum Actincytoskelett her. Depletion von CD2AP in Mäusen führt neben einer eingeschränkten Immunfunktion zu einem letalen Nierenversagen. Dies kann auf eine Fehlfunktion der Podocyten im Glomerulus zurückgeführt werden. CD2AP interagiert auch mit Nephrin, dem Hauptbestandteil der Schlitzmembran, die für die Ultrafiltration in der Niere verantwortlich ist (Shih *et al.*, 1999). Vergleichende Sequenzanalysen der CP-Inhibitoren CARMIL, CKIP-1 und CD2AP (Bruck *et al.*, 2006; Canton *et al.*, 2006; Uruno *et al.*, 2006) identifizierten ein mögliches CP-Bindemotiv: LxHxTxR₆PK(x)₆P (Bruck *et al.*, 2006).

Einige Proteine wirken als Antagonisten von CP und regulieren so indirekt

Wie bereits oben erwähnt konkurrieren Formine mit CP um das + Ende von Filamenten. Auf diese Weise verhindern sie sehr effektiv die Bindung von CP und unterstützen das Wachstum des Filaments am + Ende (Goode and Eck, 2007; Pollard, 2007; Staiger and Blanchoin, 2006; Zigmond *et al.*, 2003).

Auch Proteine der sog. *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP) Familie besitzen möglicherweise einen anti-*capping*-Effekt. Sie interagieren mit F-Actin und einer Vielzahl von anderen Actin bindenden Proteinen, wie z.B.: WASP, dem Arp2/3 Komplex und ActA (Krause *et al.*, 2003). Proteine der VASP Familie werden an den Spitzen von Filopodien gefunden, wo sie möglicherweise *capping* inhibieren um die Elongation von Filopodien zu ermöglichen (Applewhite *et al.*, 2007; Mejillano *et al.*, 2004). Allerdings ist dieser Effekt unspezifisch, so dass auch die Bindung anderer Proteine, z.B. Gelsolin, an das + Ende inhibiert wird. Andere Studien konnten jedoch keine Inhibition von CP durch VASP feststellen, wohl aber eine wichtige Rolle für die Formation von Filopodien (Schirenbeck *et al.*, 2006).

1.3.4 Die Rolle von CP in zellulären Prozessen

Eine paradoxe Beobachtung: capping unterstützt amöboide Bewegung

Wie bereits anfangs erwähnt ist amöboide Zellmigration ein komplexer Vorgang. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass CP eine Schlüsselrolle bei amöboider Bewegung und dem Aufbau von dynamischen Actin Netzwerken zukommt, sowohl *in vivo* (Bear *et al.*, 2002; Hug *et al.*, 1995; Iwasa and Mullins, 2007; Mejillano *et al.*, 2004) als auch *in vitro* (Loisel *et al.*, 1999; van der Gucht *et al.*, 2005). *Dictyostelium* Zellen migrieren beispielsweise schneller wenn CP überexprimiert wird und langsamer bei Unterexpression (Hug *et al.*, 1995). CP ist an der Ausbildung von Lamellipodien am Vorderende der migrierenden Zelle beteiligt. Zugabe von chemotaktischen Substanzen zu *Dictyostelium* Zellen führt zur Rekrutierung von CP zur Zellperipherie und zur Polymerisation von Actin (Eddy *et al.*, 1997). In *Drosophila* S2 Zellen, *Xenopus* Fibroblasten und Melanomzellen von Säugern ist CP hauptsächlich am Vorderende von Lamellipodien zu finden; eine Depletion führt zum Verlust des Actin Netzwerks im Lamellipodium (Iwasa and Mullins, 2007; Mejillano *et al.*, 2004; Miyoshi *et al.*, 2006). Diese *in vivo* Daten werden von *in vitro* Daten unterstützt, die zeigen, dass CP für die Rekonstruktion von actinbasierender Motilität essentiell ist (Loisel *et al.*, 1999).

Allen Studien gemein ist jedoch eine paradoxe Beobachtung: CP, welches Elongation von Filamenten terminiert (s. oben), unterstützt den Aufbau von Actin Netzwerken und beschleunigt actinbasierende Zellbewegung. Bis heute wurden zwei gegensätzliche Hypothesen zur Klärung dieses Paradoxons formuliert. Von Carlier und Pantaloni stammte die sog. *funneling* Hypothese (vom engl. *funnel* = Trichter). Sie basiert auf der Annahme, dass schnellere Bewegung auf schnellerer Filamentelongation beruht. Demnach erhöht CP die Konzentration von Actinmonomeren indem es an fast alle freie + Enden einer Zelle bindet, was weiteren Verbrauch von G-Actin verhindert. Die erhöhte Monomerkonzentration ermöglicht dann einer kleinen Zahl von Filamenten schnelle Elongation, was zu schneller Zellmigration führt (Carlier and Pantaloni, 1997). Die *funneling* Hypothese sieht in CP also eine Art Trichter, der G-Actin einer kleinen Zahl von Filamenten zuführt.

Gegen diese Hypothese sprechen einige neuere Arbeiten, vor allem die Arbeit von Akin and Mullins aus dem Jahr 2008. Unter Zuhilfenahme eines *in vitro* Modells konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration von CP weder die Zahl der freien + Enden verändert, noch die Konzentration an G-Actin erhöht. Allerdings hat die Erhöhung der CP Konzentration eine dramatische Erhöhung der Arp2/3-abhängigen Nukleationsrate zur Folge. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von Akin und Mullins die zweite Hypothese zur Rolle von CP in amöboider Zellmigration formuliert, das sog. *monomer gating model*. Demzufolge kann G-Actin prinzipiell an zwei Prozessen am *leading edge* der Zelle teilnehmen. Entweder die Elongation eines bereits existierenden Filaments oder es bindet am Arp2/3 Komplex und bildet einen Nukleus für die Polymerisation eines neuen Filaments. Um an der Nukleation teilzunehmen, muss G-Actin an einen NPF gebunden sein (Dayel and Mullins, 2004), kann aber in diesem Zustand auch an freie + Enden binden (Co *et al.*, 2007; Higgs *et al.*, 1999). Mit anderen Worten konkurrieren der Arp2/3 Komplex mit freien + Enden um NPF gebundenes G-Actin. Bindet nun CP an freie + Enden so wird das Gleichgewicht zwischen Elongation und Nukleation zur Nukleation hin verschoben. Durch die Termination der Elongation eines Filaments wird NPF gebundenes G-Actin zur Verfügung gestellt, was verstärkte Nukleation und eine dichteres Netzwerk zur Folge hat. Auf diese Weise verändert CP weder die Zahl der freien + Enden noch die Konzentration an G-Actin (wie die *Funneling* Hypothese annimmt) aber es verändert die Architektur des Actin-Netzwerks dramatisch (Akin and Mullins, 2008). Inhibition oder Depletion von CP sollte daher zu einer Umorganisation von Actin-Netzwerken führen: von dendritischen, also stark verzweigten Netzwerken - wie in Lamellipodien - zu gebündelten, langen Actinfilamenten, wie sie in Filopodien zu finden sind. Für Maus-Melanoma Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von CP zum Verlust von Lamellipodien und zur explosionsartigen Formation von Filopodien führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zusätzliche Depletion von VASP, einem CP Antagonisten, zum Verlust der Filopodien führt (Mejillano *et al.*, 2004).

Im Rahmen des *monomer gating* Modells kann der Effekt von CP auf die Zellmotilität also folgendermaßen zusammengefasst werden. Zur Fortbewegung brauchen Zellen lamellipodiale Fortsätze. Um möglichst viel Kraft in den Lamellipodien zu erzeugen, ist es von Vorteil, kurze und daher mechanisch stabile Filamente zu polymerisieren. Durch die *capping*-Aktivität von CP wird das Gleichgewicht zwischen Elongation existierender Filamente und Nukleation neuer Filamente zur Nukleation hin verschoben. Ein dichtes; aus kurzen, rigiden Filamenten aufgebautes Netzwerk ist die Folge. Von der messbaren Steifigkeit von F-Actin konnte die optimale Länge von F-Actin berechnet werden, die am effektivsten Membranen und andere Lasten verschieben kann. Sie ist mit 30-150 nm erwartungsgemäß kurz, längere Filamente verbrauchen Energie für intramolekulare Flexions- und Torsionsbewegungen (Mogilner and Oster, 1996). Des Weiteren wird durch die Arp2/3-abhängige Nukleation, für eine stetige Neuausrichtung der neuen Filamente in Bewegungsrichtung gesorgt (Akin and Mullins, 2008). Eine höhere Konzentration an CP führt daher zu erhöhter Motilität. Eine Regulation der Bewegung kann durch das Zusammenspiel von CP und Antagonisten wie VASP erreicht werden.

Funneling sieht in CP einen Trichter, der den Fluss von Actinmonomeren einem Teil der + Enden zuführt und deren Elongation bewirkt. *Monomer gating* hingegen sieht in CP einen Schalter, der

zwischen Filament Elongation und Filament Nukleation wählt um so die Architektur des Actinnetzwerks zu verändern. Die genaue Funktion von CP bei amöboider Zellmigration können nur weitere Studien klären.

CP ist ein Bestandteil des Dynactin Komplex

CP kommt in Zellen auch als Teil des Dynactin-Komplex vor (Schafer *et al.*, 1994a). Dynactin verbindet Motorproteine wie Dynein mit Vesikeln und anderen subzellulären Strukturen. Da die Funktion von Dynein in vielen, vielleicht allen, Fällen Dynactin-abhängig ist (Schroer, 2004), sind die zellulären Funktionen von Dynactin mannigfaltig. Außerdem beeinflusst es auch die Aktivität eines weiteren, auf Mikrotubuli basierenden Motorproteins: Kinesin II (Deacon *et al.*, 2003). Früh während Apoptose werden mehrere Dynactin-Untereinheiten abgebaut, was die Wichtigkeit von Dynactin unterstreicht (Lane *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist es in Centrosomen zu finden, wo es möglicherweise Mikrotubuli verankert (Clark and Meyer, 1992; Gill *et al.*, 1991; Kahana *et al.*, 1998; Paschal *et al.*, 1993).

Dieser asymmetrische Proteinkomplex besteht aus verschiedenen Polypeptiden: *actin related protein* 1 und 11 (Arp1, Arp11), p62, p25, p27, Dynamitin, p150^{Glued}, p24/22 sowie CP. Einige davon kommen mehrfach vor, sodass ein Molekül aus mehr als 20 einzelnen Proteinen aufgebaut ist. Sie bilden eine große, balkenförmigen Struktur von der ein flexibler Arm absteht (Abb. 6).

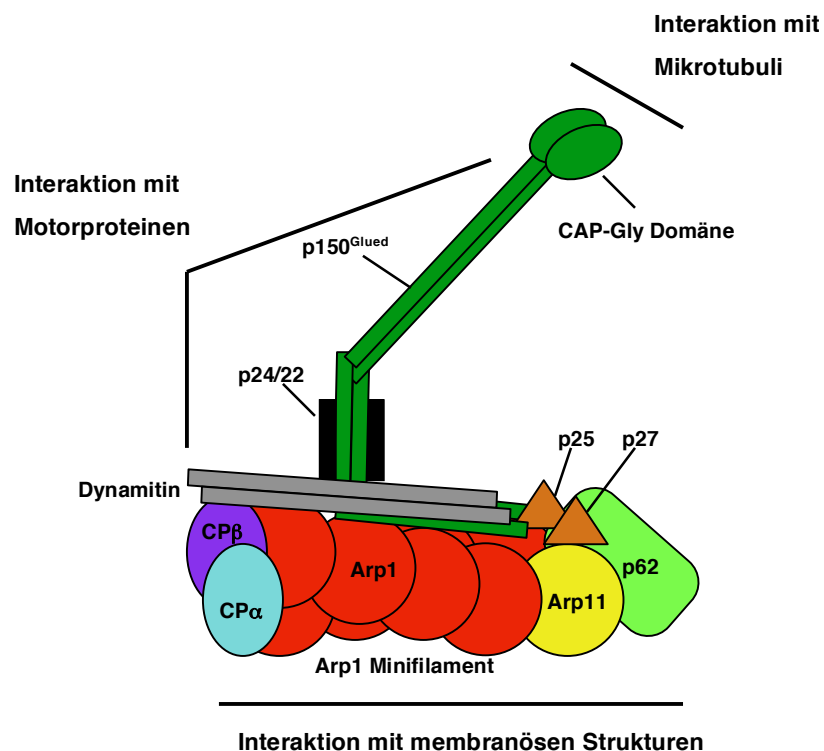


Abb. 6 Schematisches Modell des Dynactin Komplex. Die Funktionen der einzelnen Untereinheiten sind ausführlich im Text beschreiben. Für Interaktionen verantwortliche Strukturen sind angedeutet. Verändert nach Schroer, 2004.

Für die Bindung an Mikrotubuli ist der N-Terminus der p150^{Glued} Untereinheit verantwortlich. Hier findet sich die sog. CAP-Gly Domäne (vom engl. *cytoskeleton-associated protein, glycine rich*) (Riehemann and Sorg, 1993); sie alleine kann *in vitro* und *in vivo* Mikrotubuli binden (Vaughan *et al.*, 2002; Waterman-Storer *et al.*, 1995). Durch diese Interaktion wird außerdem die fortschreitende Bewegung von Dynein entlang von Mikrotubuli unterstützt. (Karki and Holzbaur, 1995; King and Schroer, 2000; Vaughan and Vallee, 1995). Menschen mit einer mutierten CAP-Gly Domäne leiden unter einer Beeinträchtigung motorischer Neuronen, die sich als Paralyse der Larynx-Muskulatur und Atrophie in Extremitäten und Gesicht manifestiert (Puls *et al.*, 2003). Des Weiteren ist der mittlere Teil von p150^{Glued} der Bereich von Dynactin, an dem die Motorproteinen Dynein und Kinesin II binden (King *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2002) (Deacon *et al.*, 2003).

Die beiden funktionellen Teile von Dynactin werden durch die Dynamitin Untereinheiten miteinander verbunden (Schroer, 2004). Ein Überschuss an freiem Dynamitin löst jedoch verschiedene Teile (p150^{Glued}, p24/22) aus dem Dynactin Komplex (Echeverri *et al.*, 1996; Eckley *et al.*, 1999; Karki *et al.*, 1998).

Der große, balkenförmige Teil ist für die Bindung an subzelluläre Strukturen verantwortlich und wird von einem Minifilament aus acht Arp1 Monomeren; sowie Arp11, p62, p25, p27 und CP gebildet. Dieser Teil des Dynactin-Komplex ist stärker konserviert als der flexible Arm (Eckley and Schroer, 2003). Im Gegensatz zu konventionellem Actin sind Arp1 Filamente deutlich stabiler, sehr kurz und von uniformer Länge. Arp1 bindet direkt an eine spezialisierte Spectrin Isoform. Dieses β III-Spectrin ist vor allem an Golgi Membranen zu finden (Holleran *et al.*, 2001). Möglicherweise ist die Interaktion mit Proteinen der Spectrin Familie ein genereller Mechanismus der Dynactin-Bindung an subzelluläre Strukturen. Arp11 ist mit dem - Ende des Arp1-Polymers assoziiert. Die primär Sequenz von Arp11 lässt vermuten, dass es zwar an das - Ende von Filamenten (aus konventionellem Actin und Arp1) binden kann aber keinen weiteren Einbau von Monomeren zulässt (Schroer, 2004).

Die Funktionen der anderen Bestandteile des balkenförmigen Teils - p62, p25, p27 und CP - sind bislang nicht gut verstanden. In Hefe beispielsweise fehlen p62, p25 und p27 ganz und die Depletion von CP keine Auswirkung auf die Funktion von Dynein (Moore *et al.*, 2008).

Die konservierten Untereinheiten der balkenförmigen Domäne von Dynactin wurden auch in *Plasmodium* identifiziert; die des weniger stark konservierten Arms jedoch nicht. Es ist dennoch anzunehmen, dass *Plasmodium* und andere Apicomplexa über einen funktionellen Dynactin Komplex verfügen. Eine Ausnahme bildet möglicherweise *Theileria*, wo keine der Dynactin-Komponenten gefunden werden konnte (Gordon and Sibley, 2005).

CP ist integraler Bestandteil der Z-Linie von Quergestreifter Muskulatur

CP aus Skelettmuskulatur wird als CapZ bezeichnet, da es an den Z-Scheiben der Sarkomere zu finden ist (Casella *et al.*, 1987). Auch die + Enden der Mikrofilamente sind ebenfalls an der Z-Scheibe zu finden und es konnte gezeigt werden, dass je ein Molekül CapZ je ein + Ende bindet (Schafer *et al.*, 1993). Nicht funktionales CapZ zerstört die Architektur von Myofibrillen im Mäuseherz (Hart and Cooper, 1999). CapZ verankert Mikrofilamente in der Z-Scheibe. Neuere Studien konnten eine Interaktion von CP mit Nebulin, einem anderen Protein der Z-Scheibe, nachweisen. Depletion von

Nebulin in sich entwickelnden Mausmuskelzellen führt zu einer verringerten Akkumulation von CapZ in der Z-Scheibe und einer schlechten Ausrichtung der + Enden (Pappas *et al.*, 2008).

1.3.5 Das *capping protein* in *Plasmodium*

Über die Funktion von CP in *Plasmodium* ist bisher nicht viel bekannt. Beide Untereinheiten sind im Genom kodiert und gehören zu den größten bekannten Untereinheiten (Schuler and Matuschewski, 2006). Beim Vergleich des Genexpressionsmuster von kaum infektiösen *P. berghei* Mitteldarmsporoziten und hoch infektiösen Speicheldrüsensporoziten wurde die β -Untereinheit als eines der Gene beschrieben, welche im infektiösen Stadium stärker exprimiert werden. Erstaunlicherweise wurde nur eine Untereinheit des üblicherweise als Heterodimer fungierenden Proteins identifiziert und als *up-regulated in infective sporozoites 17* (UIS17) beschrieben (Matuschewski *et al.*, 2002b).

Eine etwas ältere Arbeit beschreibt die biochemische Funktion eines F-Actin bindenden Komplexes aus *P. knowlesi* Merozoiten. Dieser Komplex besteht aus drei Proteinen, von denen eines genauer identifiziert werden konnte, das sog. *heat shock protein 70* (HSP70). Die beiden anderen Proteine besitzen eine Masse von 32 bzw. 34 kDa. Mit diesem Komplex angereicherte Fraktionen eines Lysats aus Merozoiten inhibierten die Polymerisation von Skelettmuskelactin, sodass Filamente in Anwesenheit des Komplexes signifikant kürzer waren. Diese Eigenschaft war Calcium-unabhängig und konnte durch die Zugabe von PIP₂ gehemmt werden (Tardieux *et al.*, 1998a). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den beiden 32 und 34 kDa schweren Proteinen um die beiden Untereinheiten von CP handelt. Formal konnte dies jedoch noch nicht gezeigt werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der Malariaparasiten *Plasmodium* besitzt nur eine kleine Anzahl von Proteinen, die im Verdacht stehen an der Regulation von Actin beteiligt zu sein. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Lokomotion von *Plasmodium* F-Actin abhängig ist (Dobrowolski and Sibley, 1996; Miller *et al.*, 1979). Weiter unklar ist jedoch wie Filamente stabilisiert werden. Möglicherweise spielt dabei das heterodimere *capping protein* eine entscheidende Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Funktion von CP für den Malariaparasiten *Plasmodium* mit Hilfe von genetischen, biochemischen und parasitologischen Methoden untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoklav	Stystec GmbH, 5057 ELV, Wetttenberg
Drehrad	Stuart, VWR, Darmstadt
Drigalski-Spatel	Neolab
Dynal <i>dynabeads</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Eismaschine	AF30 Scotsman, Mailand, Italien
Elektroporationsgerät <i>Nucleofector</i>	Amaxa, Lonza, Köln
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena
Gasflussregulator Flowbuddy	Flystuff, San Diego, USA
Gefrierschränke	Liebherr, Biberach; Sanyo
Gel-Apparaturen	GibcoBRL, Karlsruhe; Hoefer, HE33
Gel-Gießapparatur (SDS-Gele) <i>mighty small glass feeder</i>	Hoefer
Heizblock	Auftragsfertigung Glasbläser
Inkubator für Transfektionen	Alpha Laboratories, DB1010
Kamera- Gelfotographien	Mytron, Heiligenstadt
- Fluoreszenzmikroskop	DC120 Zoom Digital Kodak, New York
	CoolSnap HQ camera, Photometrics, Tucson, USA
Kühlschränke	Liebherr, Biberach
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5415R, Eppendorf
Lichtmikroskop	Zeiss Axiolab, Carl Zeiss, Jena
Magnetheizrührer	Heidolph, MR 3001, Schwabach
Reinstwasser-Anlage	USF ^{ELGA} , Celle
Mikrowelle	LG, Electronics Inc.
Mikroinjektor Nanoject II	Drummond Scientific, USA
Mückenkäfige	BioQuip Products Inc., USA
Netzgerät Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
	Electrophoresis Power Supply, EPS 301
PCR-Maschine	Gene Amp, PCR System 9700, Applied Biosystems
pH-Meter	Inolab, VWR, Darmstadt
Pipetten: Gilson	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Poröse Polyethylen-Platte Flypad	Flystuff, San Diego, USA

Quarzküvetten	Amersham, Freiburg
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Innova 4300
Ultraschallstab	Sonifier®B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Spektrophotometer	GeneQuant pro Amersham, Freiburg
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus Instruments / Sterilgard ClassII Type A/B3, The Baker Company, USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D, Eppendorf
Vortex	Vortex-Genie, Scientific Industries Roth, Karlsruhe
Waagen	Sartorius GmbH, Göttingen
Wasserbad GFL	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wasserbad Julabo U3	Julabo, Seelbach
Zählkammer	Neubauer Labotec, Göttingen
Zellkulturzentrifuge	Megafuge 2.0R, Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

15 / 50 ml Plastik-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
8- <i>well</i> -Objektträger	Medco
Deckgläser	Knittel
Elektroporationsküvetten	Amaxa, Lonza, Köln
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Einbeck
Handschuhe	VZM, Heidelberg
<i>HisTrap HP columns</i>	GE Healthcare, Piscataway, USA
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Kanülen	BD Microlance, Becton Dickinson
Kryogefäße	Nalgene®
Objektträger	Menzel
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten	WU Mainz
PCR-Gefäße, Petrischalen, Pipettenspitzen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter BD	Nalgene®, Thermo Fisher Scientific, Bonn
Spritzen	Diskardit, Becton Dickinson
Zellkulturflaschen	Renner, Dannstadt-Schauernheim

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amaxa, Lonza, Köln; Axis Shield, Oslo, Norwegen; Bayer, Leverkusen; BDH Laboratory Supplies; Braun, Melsungen; Difco Laboratories, Augsburg; GibcoBRL, Karlsruhe; Gibco Invitrogen, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Riedel-de Haen; Roche, Karlsruhe; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Taufkirchen; Vector Laboratories, Burlingame, USA; Whatman, Großbritannien.

2.1.4 Marker, Puffer, Medien und Lösungen

Ampicillin-Stocklösung	100 mg / ml Ampicillin in ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	100 ml Methanol; 1,5 ml Essigsäure; 0,125 % <i>Brilliant blue</i> R250; ddH ₂ O ad 200 ml
Coomassie-Entfärber	10 ml Methanol; 3,75 ml Essigsäure; ddH ₂ O ad 500 ml
Deckglas-Siegelfett	1:1:1 Vaseline, Lanolin, Parafin
DNA-Größenmarker <i>generuler</i> 1 kb	Fermentas, St. Leon-Rot
6 x DNA Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>human T-cell Nucleofactor solution</i>	Amaxa, Lonza, Köln
LB-Agar	LB-Medium, 15 g / l Agar
Luria Broth- (LB-) Medium	10 g / l Bacto- Trypton, 5 g / l Hefe- Extrakt, 5 g / l NaCl, pH 7,5; autoklavieren
Mos20 <i>freezing solution</i>	52,5 % Medium 199 (Gibco); 40 % hitzeinaktiviertes FCS; 7,5 % DMSO
Mos20 Medium	Medium 199 (Gibco), 10 % hitzeinaktiviertes FCS; 0,1 mg / ml Gentamycin
Moskito-Aufzuchtswasser	1 ‰ Meersalz in ddH ₂ O
3 M NaAc-Lösung	24,06 g ad 100 ml ddH ₂ O; pH 4,8
<i>P. berghei freezing solution</i>	Glycerin, Alsever's Solution (1:9)
<i>P. berghei</i> Kulturmedium (Transfektion)	40 ml RPMI-Medium 1640, 25 mM HEPES, L-Glutamin (Gibco); 35 ml FCS, 50 µl Gentamycin (50 mg / ml)
<i>P. berghei ookinete complete</i> Medium	<i>Incomplete</i> Medium; 10 % hitzeinaktiviertes FCS; 100 nM Hypoxanthin; 50 nM Xanthurensäure; pH 8,0
<i>P. berghei ookinete incomplete</i> Medium	0,425 g NaHCO ₃ ; 2,5 ml Penicillin / Streptomycin (je 10.000 U / ml); pH ~8,0; ad 500 ml RPMI-Medium 1640

Proteinaufreinigung Waschpuffer	20 mM Tris pH 8,0; 20 mM Imidazol; 300 mM NaCl und 10 % Glycerol
Proteinaufreinigung Elutionspuffer	20 mM Tris pH 8,0; 400 mM Imidazol; 300 mM NaCl und 10 % Glycerol
PBS	1,370 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH_2PO_4 , 81 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,4
100 x Pyrimethamin-Stocklösung	7 mg Pyrimethamin / ml in DMSO
2 x SDS-Puffer	250 mM Tris pH6,8; 6,6 % SDS; 24 % Glycerin; 10 mM EDTA; 6 % β -Mercaptoethanol; Bromphenolblau
1 x SDS-Gel-Laufpuffer:	250 mM Glycin 25 mM Tris / HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS
10 % Sucrose-Nährösung	10 g Sucrose, 20 μg pABA; ad 100 ml ddH ₂ O
50 x TAE-Puffer	2 M Tris, 250 mM Natriumacetat, 0,5 mM EDTA; pH 7,8 TBST 20 mM Tris pH 7,6; 137 mM NaCl ; 0,1 % Tween
Tris / HCl, pH 6,8	0,5 M Tris / HCl, pH 6,8
Tris / HCl, pH 8,8	1,5 M Tris / HCl, pH 8,8
1.000 x Xanthurensäure Stocklösung	51,3 mg Xanthurensäure in 1 M NaOH lösen, ad 5 ml ddH ₂ O

2.1.5 Verwendete Kits

<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn
<i>HiSpeed Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Megaskript T7</i>	Ambion, Huntingdon, England
<i>Micro-FastTrack 2.0 Kit</i>	Invitrogen
<i>QIAamp DNA-Blood Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAGEN PCR Purification Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>RETROscript</i>	Ambion, Huntingdon, England

2.1.6 Verwendete Proteine

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Ambion, Huntingdon, England; New England Biolabs GmbH, Frankfurt; MBI Fermentas, St. Leon-Rot und Roche, Mannheim bezogen. Bovines Actin aus nicht-muskulärem Gewebe wurde von Cytoskeleton, Frankfurt bezogen.

2.1.7 Sequenzierungsreaktionen und Oligonukleotide

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma *gatc Biotech*, Konstanz durchgeführt. Die dazu verwendeten Oligonukleotide wurden entweder gestellt oder mit gesandt. Alle hier angegebenen Oligonukleotide für die PCR wurden von *Invitrogen Custom Primers* bezogen. Die jeweiligen Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen; die Sequenz der Oligonukleotide ist jeweils von 5' nach 3' angegeben:

b3D+ 3'UTR forVIII_BamHI	CG <u>CGGATCCC</u> GTTTTTCTTACTTATATAT
b3D+ 3'UTR revIX_EcoRI	CG <u>GAAATTC</u> CGGTGTGAAATACCGCACAGA
DOUBLEexp1+HIS PbCP α for_BamHI	CG <u>GGATCC</u> GATGGACAGCTTATTAATGAAAAG
DOUBLEexp1+HISPbCP α rev_NotI	ATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> TCATACTAACTTAATT TGAGTTGGGATATCC
GST α cap for_EcoRI	CG <u>GAAATTC</u> ATGGACAGCTTATTAATGAAAAG
<i>PbCPα</i> RT rev	GGGTAATTCCCAGTTTGGTGGTCACTCC
<i>PbCPβ</i> int forI_EcoRI	CG <u>GAAATTC</u> ATCGATGCAGTATTAAGCATATGC
<i>PbCPβ</i> int revII_BamHI	CG <u>CGGATCCC</u> AATACCCTCCCTTATTTTTCCC
<i>PbMyoA</i> forI	GCATGCCTTATCTATTTTAGAAGCCC
<i>PbMyoA</i> revII	TTAAGCAACCATTCTCTTTCTTATATGAGC
17rep Δ 46forI_SacII	AT <u>CCCCGCGG</u> AGTACATGCAATATATACATA TATATTCAATGC
17rep Δ 46revII_NotI	ATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> AATTTAGTTTTTTTA TATGGTTATTTATTATTACAG
17rep Δ 46forIII_HindIII	CCCC <u>AAGCTT</u> GAATGCGATTTTAGGGGCCAATAC AATTAGC
17rep Δ 46revIV_KpnI	CG <u>GGGTACCC</u> GATTTTTTTTATTAATTCATCAAA TTTTCCC
MGUIS17-forIVtest	CAAAATATATATTTAAAACAATTATATGTGTATAATG
CP α rep Δ 34forI_SacII	AT <u>CCCCGCGG</u> GATAGGTAACAACCTTACAAAAAAA CAAAAAGG
CP α rep Δ 34revII_NotI	ATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> TCCATTGGCCTTATTTTT AACCG
CP α rep Δ 34forIII_HindIII	CCCC <u>AAGCTT</u> GCACATTTACTCGTGTTTTTCCTTT TTTGGGG
CP α rep Δ 34revIV_Kpn	CG <u>GGGTACCC</u> CCTCAAAAGCTCAAGAAAAAATG AAATCC
CP α rep Δ 34forV_NotI	ATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> ATGAATAACATGT TAAATGAAAAG
CP α rep Δ 34revVI_BamHI	CG <u>CGGATCC</u> TTATGTGCTTTTAATTAATTTTT ATTTATGTTTGTG

CP α rep+34revVII_BamHI	CGCGGATCCTTATTTTTTTTTTAATGTGTAAT AATTTAAACCTG
mCherry forI_NotI	ATAAGAATGCGGCCGC AAAATGGTGAGCAAGG GCGAGGAGG
mCherry revII_SpeI	GGACTAGTCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGC CGGTGG
<i>PbCP</i> α RT for	GATGCAAACATAAATTTTAAGACACGG
GST α cap rev_NotI	ATTTGCGGCCGCTCATACTA ACTTAATTTGAGT
α 5' test	CCGATTAATAATACGAATACAAAGTGAG
α 3' test	GCGAATAACCAAATAATGAATAATTCTC
Tg rev PRO	CGCATTATATGAGTTCATTTTACACAATCC
b3D+ rev X	CCTTGCTCATTTACCTGCTAATACGATTGC
DOUBLEexp2PbCP β for_MfeI	CAATTGGATGGAAGACATAAAAAATAATGAAGA TAAATCGATGC
DOUBLEexp2-S.tag PbCP β rev_KpnI	CGGGGTACCCTAAGTATTAAGCATATATTCTGTT CCACC
DOUBLEexp1+hisPbCP β for_BamHI	CGGGATCCGATGGAAGACATAAAAAATAATGA AGATAAAATCGATGC
DOUBLEexp1+hisPbCP β rev_NotI	ATAAGAATGCGGCCGCCTAAGTATTAAGCATA TATTCTGTTCCACC

2.1.8 Vektoren

Für Transfektion wurde ein modifizierter b3D.DT^H.^D Vektor verwendet (ursprünglich bezogen von A.P. Waters, Universität Leiden, Niederlande). Der Vektor besitzt als Positivselektionsmarker ein mutiertes Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthetase Gen (*dhfr/ts*) von *Toxoplasma gondii*. Dessen Expression wird von den 5' und 3' flankierenden Regionen des *P. berghei* *DHFR/TS*-Gens kontrolliert und verleiht Plasmodien Resistenz gegenüber Pyrimethamin. Des Weiteren enthält der Vektor ein β -Lactamase Gen, welches Bakterien Resistenz gegenüber Ampicillin verleiht. Nach Transformationen können somit Bakterien selektioniert werden. Der Vektor besitzt daher die Eigenschaft eines *E. coli* / *Plasmodium shuttle*-Vektors. In dieses Plasmid wurde zusätzlich die *P. berghei* *DHFR/TS* 3' flankierenden Region (3' FR) kloniert (b3D+ 3'UTR forVIII_BamHI / b3D+ 3'UTR revIX_EcoRI). Der so entstandene Vektor wurde b3D+ genannt und für alle Transfektionen verwendet.

Für Proteinüberexpression wurde der Vektor pET-Duet-1 von Novagen (Kat. # 71146-3) verwendet. Dieser ermöglicht die simultane Expression von zwei Proteinen. pETDuet-1 besitzt zwei sog. *multiple cloning sites* (MCS), in die je ein Zielgen kloniert werden kann. Beide MCS stehen unter der Kontrolle je eines T7 Promotors (T7) und eines *lac* Operators. Mit dem Lactose-Analog Isopropyl-1thio- β -D-galactopyranosid (IPTG) kann die Koexpression induziert werden. Darüber hinaus kann an beide Proteine ein Peptid fusioniert werden, welches die spätere Aufreinigung ermöglicht. Die MCS I

fusioniert N-terminal ein Hexahistidinpeptid (6His); die MCS II fusioniert C-terminal ein sog. *S-tag*. pETDuet-1 verleiht Resistenz gegenüber Ampicillin.

2.1.9 Zelllinien und Bakterienstämme

Aedes aegypti Mos20 Zellen für die Untersuchung der Motilität von Ookineten wurden von Inga Sidenkiamos, Kreta, Griechenland bezogen.

Zur Transformation von Ligationsprodukten im Rahmen von Klonierungen wurden *E. coli* XL-1blue-Competent-Zellen (Stratagene) verwendet. Die Expression von rekombinanten Proteinen fand im *E. coli* Stamm BL21(DE3)RIPL (Stratagene) statt.

2.1.10 Tierstämme und Tierhaltung

Mäuse und Ratten

Von Charles River Laboratory, Sulzfeld, Deutschland, wurden folgende Maus- und Ratten-Stämme bezogen: Naval Medical Research Institute-Mäuse (NMRI); C57Bl6-Mäuse; Sprague Dawley Ratten (SD). Von Harlan Laboratories, Paderborn, wurden Theiler's Original-Mäuse (TO) bezogen. Die Haltung der Ratten und Mäuse erfolgte in Makrolon-Käfigen. Die Besatzdichte lag in der Regel bei 5 Mäusen bzw. 2 Ratten pro Käfig. Die Käfige standen in Räumen bei konstanter Raumtemperatur von 22 °C und einer relativen Feuchtigkeit von 50-60 %. Der Hell- / Dunkelrhythmus lag unabhängig von der Jahreszeit täglich bei 12 h. Gefüttert wurden die Tiere mit Standard-Trockenfutter von SSNIFF, Soest.

Moskitos

Verwendet wurden *Anopheles stephensi* Moskitos (Nijmegen, Niederlande; EMBL, Heidelberg). Für die zur Eiproduktion benötigte Blutmahlzeit wurden zwei Mäuse mit Ketamin / Xylazin-hydrochlorid narkotisiert und 15 min auf einen Käfig gelegt, in dem sich 2-7 Tage alte Moskitos befanden. 4 Tage nach der Blutmahlzeit fand die Eiablage statt. Hierfür wurde den Moskitos eine mit Aufzuchtswasser gefüllte Petrischale zur Verfügung gestellt, die mit einem Faltenfilter ausgelegt war. Die Eier wurden über den Faltenfilter zuerst mit Aufzuchtswasser, dann mit 70 % Ethanol gewaschen und in eine mit Aufzuchtswasser gefüllte Larvenschale gegeben. Alle zwei Tage wurden die geschlüpften Larven gewaschen und, wenn nötig, vereinzelt. Die Fütterung erfolgte täglich mit 1 / 3 Katzen-Trockenfutter. Puppen konnten ab dem neunten Tag nach Ei-Entnahme abgesammelt und zum Schlüpfen in eine Petrischale in einen Moskito-Käfig gegeben werden. Die Fütterung der Moskitos erfolgte täglich durch einen in 10 % Sucrose-Lösung (mit 0,2 µg / ml para-Aminobenzoesäure (pABA)) und einen in Aufzuchtswasser getränkten Wattebausch. Die Haltung der Moskitos erfolgte bei 20 °C (Insektarium) bzw. 28 °C (Aufzuchtstraum) und 80 % Luftfeuchtigkeit, wobei ein Hell- / Dunkelrhythmus von 14 h zu 10 h eingehalten wurde.

Plasmodium Parasiten

In dieser Arbeit wurde mit zwei *Plasmodium*-Stämmen gearbeitet: *P. berghei* NK65 und der *P. berghei* ANKA Klon cl 507. Wenn nicht gesondert erwähnt, wurden immer NK65 Parasiten verwendet. Beide Parasitenlinien sind sensitiv gegenüber Pyrimethamin.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Präparation von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*: Je nach benötigter Menge an DNA wurde entweder eine Maxi oder Mini Präparation unter Verwendung eines Kits (*QIAGEN HiSpeed Plasmid Maxi Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit*) durchgeführt. Da Plasmide als doppelsträngige, geschlossene, helikale Ringe vorliegen, sind sie nach alkalischer Denaturierung noch verbunden im Gegensatz zu chromosomaler DNA der Bakterien und können anschließend schneller renaturieren. Durch diese Eigenschaft lässt sich Plasmid DNA von chromosomaler DNA mit geeigneten Puffern (P2 Puffer: alkalische Denaturierung; N3 Puffer: Renaturierung) trennen. Nach Zugabe des Renaturierungspuffers geht nur Plasmid DNA in Lösung, während genomische DNA und ausgefällte Proteine abzentrifugiert werden können. Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers der verwendeten Kits. Plasmid DNA wurde bei - 20 °C gelagert, Konzentrationsbestimmungen erfolgten photometrisch.

Alkoholfällung von DNA: Bei dieser Methode wird ausgenutzt, dass gelöste DNA, nachdem sie in Lösung mit einem einfach geladenen Salz versetzt wurde, durch Alkohol spontan ausfällt. Man nutzte dies zum Anreichern von DNA und zur Reinigung von DNA-Lösungen, da Salze und andere wasserlösliche Substanzen gelöst bleiben. Als Salz wurde Natriumacetat verwendet, dessen Konzentration vor Zugabe des Alkohols 0,3 M in der DNA-Lösung betrug. Als Alkohol wurde kalter, 100 %iger Ethanol genutzt, von dem das 2,5fache Volumen der DNA-Lösung eingesetzt wurde. Die Fällung erfolgte für 30 Minuten oder länger bei - 80 °C. Die DNA konnte anschließend bei 4 °C, 15 Minuten bei 13.200 rpm sedimentiert werden. Zum Entfernen von restlichen Salzen wurde der Niederschlag mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA bei Raumtemperatur konnte die DNA wieder in Lösung genommen werden.

Präparation von mRNA

mRNA-Isolation: Zur Isolation wurde von mRNA wurde das *Micro-FastTrack™ 2.0 Kit* von Invitrogen verwendet. Dieses nutzt eine Oligo(dT)-Cellulose Matrix, an die mRNA mit ihren Poly(A)-Ende hybridisiert und so von anderen RNA Spezies trennen werden kann. Die Isolation erfolgte mit Reagenzien und nach den Angaben des Herstellers. mRNA wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei - 80 °C gelagert.

DNase Verdau von DNA-Kontaminationen: Zur Entfernung möglicher Kontaminationen durch beispielsweise genomische DNA wurde die mRNA mit DNase behandelt. Dies geschah unter Verwendung des *Megascript T7 Kits* von Ambion. Die mRNA wurde mit 1 / 10 Volumen T7 10x

reaction buffer und 1 μl TurboDNase™ versetzt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die mRNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

Phenol-Chloroform-Extraktion von mRNA: Bei dieser Methode zur Reinigung von Nucleinsäuren wurde die mRNA nacheinander mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1 v / v) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Dazwischen wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur maximal zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde jeweils unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Gefäß überführt. Auf diese Weise wurden Verschmutzungen wie Proteine denaturiert und in der organischen Phase bzw. in der Grenzschicht gesammelt, während die mRNA in der wässrigen Phase bleiben. Anschließend wurde die mRNA durch 0,6 Volumen Isopropanol und Ammoniumacetat (Endkonzentration 0,2 M) präzipitiert, um so Reste von Phenol aus der Lösung zu entfernen. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und 30 Minuten maximaler Zentrifugation bei 4 °C wurde der mRNA Niederschlag in ddH₂O gelöst und zur Reverse Transkriptase PCR verwendet (s. unten).

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren nutzt deren Absorption von ultravioletter Strahlung, die direkt proportional zum Gehalt an Nucleinsäuren ist. Die DNA-Proben wurden 1:50 in einem Endvolumen von 1 ml verdünnt und ihre Extinktionen gegen ddH₂O als Nullwert gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm ist die Absorption von DNA maximal, die von Proteinen bei 280 nm. Werden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$ verwendet so ist bei einer Konzentration von 50 μg doppelsträngiger DNA / ml die Optische Dichte (OD) gleich 1. Daraus folgt für die Konzentration einer Probe: $A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{l} / \text{ml} = \text{Gehalt in } \mu\text{g} / \text{ml}$. Aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ergibt sich die Reinheit einer DNA-Präparation. Dabei sollte ein Verhältnis $OD_{260} / OD_{280} = 1,8$ bis 2,0 erreicht werden.

Für die Photometrische Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen wurde die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt.

Gelelektrophorese von DNA im Agarosegel

Um die negativ geladene DNA auftrennen zu können, wird ihre Eigenschaft genutzt, im elektrischen Feld je nach Größe des Fragments unterschiedlich schnell zu wandern. Wegen eines konstanten Ladungs-Masseverhältnis ist die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts der DNA. Zur Auftrennung wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Zu 100 ml 1x TAE-Elektrophoresepuffer wurde 1 g Agarose gegeben und Alles für 3 min in einer Mikrowelle gekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C erfolgte die Zugabe von 10 μl Ethidiumbromid (Sigma) (5 $\mu\text{g} / 100 \text{ ml}$) oder 10 μl 10.000 x *SyberSave solution* (Invitrogen). Beide Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren mit der DNA-Doppelhelix und machen diese bei Anregung durch UV-Licht sichtbar. Diese Lösung wurde in entsprechende Kammern gegeben, wobei ein Kamm Taschen im Gel nach dessen Aushärten ausspart, in die später die Proben aufgetragen werden konnten. Zu jeder Probe wurde ein 6x DNA Ladepuffer (Fermentas) gegeben. Die Größe der

Fragmente konnte durch die Verwendung des 1 kb *gene ruler* DNA-Größenmarker (Fermentas) abgeschätzt werden.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase Kettenreaktion können selektiv bestimmte DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert werden. Hierzu verwendet man Oligonukleotide, die zu der Ausgangs-DNA, dem sog. *template*, komplementär sind und den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Außerdem besaßen einige Oligonukleotide überhängende Enden, die eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme an das amplifizierte DNA-Fragment addierte. Anschließend konnten diese mit entsprechenden Enzymen geschnitten und kloniert werden. Alle PCR-Reaktionen wurden mit *Taq*-Polymerase (Fermentas) durchgeführt. Zur Amplifizierung von DNA wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

33,5 μ l ddH₂O; 5 μ l 10 x PCR-Puffer; 5 μ l dNTPs (enthält je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP); 4 μ l MgCl₂ (25 mM); 0,5 μ l Oligonukleotid 1 (100 μ M); 0,5 μ l Oligonukleotid 2 (100 μ M); 1 μ l *template*-DNA und 0,5 μ l *Taq*-Polymerase (5 U / μ l).

Für eine Polymerase Kettenreaktion wurde die doppelsträngige *template*-DNA zunächst für 5 min bei 94 °C in Einzelstränge denaturiert. Darauf folgten 35 Zyklen aus Denaturierung für 30 sec bei 94 °C, Anlagerung (engl. *annealing*) der Oligonukleotide für 30 sec bei 55 °C und Neusynthese der DNA-Stränge für 2-6 min je nach Fragmentlänge bei 60 °C. Anschließend wurde die Reaktion bei 60 °C für 10 min abgeschlossen. Um überschüssige Oligonukleotide, Nukleotide und Proteine zu beseitigen wurden die PCR-Produkte anschließend mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* nach Protokoll des Herstellers (Qiagen) aufgereinigt und das Ergebnis der PCR in einem analytischen Agarosegel untersucht.

Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Bei einer RT-PCR polymerisiert das aus Retroviren stammende Enzym Reverse Transkriptase ausgehend von einer mRNA-Matrize die dazu komplementäre DNA, sog. cDNA. Die verschiedenen RT-Polymerase Kettenreaktionen wurden mit dem *RETROscript Kit* (Ambion) mit Reagenzien und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Oligonukleotid zur Initiation der Reaktion wurden jeweils Oligo(dT)-Decamere verwendet; üblicherweise wurden zwischen 1 und 2 μ g mRNA eingesetzt.

Zur Überprüfung der mRNA auf DNA-Kontaminationen, wurde bei jeder Reaktion eine Minus-RT-Kontrolle durchgeführt. Diese Kontrolle enthält alle nötigen Reagenzien außer der Reversen Transkriptase. So kann gezeigt werden, dass es sich bei der Matrize ausschließlich um mRNA handelte und nicht um genomische DNA. Diese hätte in nachfolgenden Polymerase Kettenreaktionen ein Signal in der Minus-RT-Kontrolle zur Folge. Die Qualität und Reinheit der cDNA wurde anschließend überprüft.

Restriktionsendonuklease Reaktionen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen, meist sechs palindromische Basenpaare, von doppelsträngiger DNA und spalten hydrolytisch Phosphordiesterbindungen. Diese Schnittstellen können gerade oder überhängend sein. Somit kann zirkuläre DNA linearisiert oder bestimmte DNA-Bereiche ausgeschnitten werden. Fragmente können durch Basenpaarung wieder

eine zirkuläre Form annehmen. Die Enzymaktivität wird in *Units* (U) angegeben; eine *Unit* entspricht dabei der Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 μg Phage λ -DNA unter optimalen Bedingungen in 1 h zu verdauen.

Pro μg DNA wurde etwa eine Enzymeinheit eingesetzt. Verdaut wurde bei 37 °C über einen Zeitraum von 2 bis 4 h oder über Nacht. Die jeweiligen Puffer (10x) und falls nötig BSA (10x) wurden jeweils auf einen Volumenanteil von 1 / 10 eingestellt. Die DNA wurde mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten, wenn beide Enzyme unter gleichen Bedingungen eine ausreichende Aktivität zeigten. Dabei wurde ein Volumenanteil der Enzyme am Restriktionsansatz (20 bis 100 μl) von 10 % nicht überschritten, da sonst das zur Lagerung den Enzymen beigemischte Glycerin unspezifisches Schneiden hervorrufen könnte. Die jeweils gewählten Reaktionsbedingungen richteten sich nach den Angaben des Enzymherstellers. Nach einem Restriktionsverdau wurde ein Aliquot oder die gesamte Reaktion im Agarosegel analysiert. Zur weiteren Verwendung wurden die Proben mit dem *QIAGEN PCR Purification Kit* aufgereinigt.

Ligation

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T₄ katalysiert in Anwesenheit von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen von nebeneinander liegenden 3' Hydroxyl- und 5' Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA. So können linearisierte Vektoren und DNA-Fragmente, sog. *inserts* wie z.B. PCR Produkte, verbunden werden. Dabei ist eine Einheit des Enzyms (1 U) definiert als die Menge, die notwendig ist, um die Konversion von 1nmol ³²P_i in ATP bei 37° C in 20 Minuten zu katalysieren.

Die Ligation wurden stets in einem Gesamtvolumen von 10 μl durchgeführt. Dem Ansatz wurde eine Einheit T₄-Ligase (Fermentas), 100-200 ng Vektor-DNA und die 4-5fache Molarität an *insert*-DNA zugegeben. Außerdem 1 μl des, vom Enzymhersteller mitgelieferten, 10 x Ligasepuffers. Mit sterilem Wasser wurde das Endvolumen auf 10 μl eingestellt. Der Ligationsansatz wurde für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden *E. coli* BL21(DE3)RIPL-Zellen verwendet, die jeweils direkt vor der Expression mit den entsprechenden Konstrukten transformiert wurden. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Kolonien mit 50 ml LB-Medium von der LB-Agar-Platte in einen Kolben gespült und mit LB-Medium aufgefüllt. Bei einer Optischen Dichte (OD₆₀₀ ~0,7) wurde die Expression der Proteine mit 0,5 mM IPTG induziert und erfolgte jeweils in 2 x 0,75 Liter LB-Medium bei 37 °C über 3 bis 5 Stunden. Anschließend wurden die Bakterien bei 15 min, 4 °C und 4000 rpm sedimentiert und der Niederschlag lysiert; um Denaturierung zu minimieren erfolgen diese Arbeiten bei 4 °C. Die Lyse erfolgte unter Verwendung des Lysispuffers *cell lytic B* (Sigma) nach Angaben des Herstellers. Zur Aufreinigung der verschiedenen rekombinanten Proteine wurden die jeweiligen Lysate auf sog. *HisTrap HP columns* gegeben und nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Diese Säulen enthalten eine Matrix mit immobilisiertem Nickel, an das die fusionierten

Hexahistidinpeptide binden und so aufgereinigt werden können. Zunächst wurden die Säulen mit Waschpuffer equilibriert und anschließend das Bakterienlysate auf die Säule gegeben. Nach dem Waschen der gebundenen Proteine wurden diese in 1 ml Fraktionen Elutionspuffer eluiert und Aliquots bei - 80 °C gelagert. Die Konzentration der Proteine wurde unter Verwendung des *BCA Protein Assay Kit* nach Angaben des Herstellers bestimmt.

Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gele entstehen durch radikalische Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylbisacrylamid. Die Porengröße des Gels hängt vom Anteil an Acrylamid und dessen Vernetzung ab. Somit lassen sich die Eigenschaften des Gels variieren. Ein Gel besteht aus zwei Abschnitten, dem großporigen sog. Sammelgel und dem engporigen sog. Trenngel. Die zu analysierenden Proteine werden durch β -Mercaptoethanol im Probenpuffer reduziert und erhalten durch SDS eine negative Ladung. Bei angelegter Spannung werden die Proteine zunächst an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel konzentriert. Im Trenngel werden sie nach ihrer molaren Masse aufgetrennt. Das unterschiedliche Laufverhalten der Proben ist abhängig vom pH-unabhängigen Verhalten der Chlorid-Ionen (Leit-Anionen) im Gegensatz zu dem pH-abhängigen Laufverhalten des Folge-Ions Glycin. Die benötigten Gele wurden wie folgt gegossen; diese Menge ist ausreichend für zwei Gele.

10 % Trenngel: Zu 5 ml Protogel wurden 3,75 ml 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8; 150 μ l 10 % SDS; 5,946 ml ddH₂O; 150 μ l APS sowie 15 μ l TEMED gegeben. Diese Mischung wurde in eine Kammer gegeben und bis zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Danach wurde das Isopropanol abgeschüttelt, mit destilliertem Wasser gespült und mit einem Papier die Reste des Wassers entfernt.

Sammelgel: Zu 700 μ l 1M Tris-Puffer pH 6,8 wurden 700 μ l Protogel; 60 μ l 10 % SDS; 3,5 ml ddH₂O; 40 μ l 10 % APS und 40 μ l TEMED gegeben. Mit dieser Mischung wurde das Trenngel überschichtet und ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt; dieser spart Kammern für die Proben aus. Nach der Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und diese mit 1x SDS-Gel-Laufpuffer befüllt. Die Proteine wurden für ca. eine Stunde bei 30 mA aufgetrennt. Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel anschließend 30 min in Coomassie-Färbelösung und eine Stunde in der Coomassie-Entfärbelösung bei Raumtemperatur geschüttelt. In ddH₂O kann das Gel gelagert werden.

capping Aktivität Assay

Für die Analyse der *capping*-Aktivität von *Plasmodium* CP wurde zunächst die Polymerisation von 5 μ M Actin Proben durch die Zugabe von MgCl₂ und KCl (Endkonzentration 1 mM MgCl₂ und 0,15 M KCl) induziert und 2-3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 100 nM Rhodamin-Phalloidin und mit 0,1 μ M rekombinantem *capping protein* versetzt. Nach 15 min bei RT wurde diese Mischung dann auf ein Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas pipettiert. Dazu wurden ausschließlich abgeschnittenen Pipettenspitzen verwendet, um Scherkräfte, die auf Polymere wirken, zu minimieren. Für die Mikroskopie wurde die Probe mit *Vectashield* (Vector Laboratories) überschichtet, auf ein Objektträger verbracht und analysiert. Die Verwendung von beschichteten Deckgläsern sollte die Adhäsion der Filamente fördern. Dazu wurden Deckgläser in eine 0,01 %ige Lösung von Poly-L-Lysin

getaucht. Anschließend konnte die anhaftende Flüssigkeit bei RT antrocknen. Die Auswertung der Bilder wurde mit dem bildverarbeitenden Programm *ImageJ* durchgeführt.

2.2.3 Mikrobiologische Methoden

Plattenkulturen von E. coli

Plattenkulturen dienen der Anzucht einzelner Bakterienkolonien sowie zur mittelfristigen Lagerung bei 4 °C. Dazu wurden die Bakterien mithilfe eines sterilen Glasspartels auf LB-Agarplatten, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Durch die anschließende Lagerung der Platten bei 4 °C bleiben sie bis zu vier Wochen haltbar.

Flüssigkulturen von E. coli

Für *E. coli*-Flüssigkulturen wurden ca. 4 ml (= Vorkultur) bzw. 150 ml LB-Medium mit Bakterienzellen inokuliert und über Nacht bei 250 rpm und 37 °C inkubiert. Bei den Bakterien handelte es sich entweder um direkt auf Agarplatten gewachsene Zellkolonien oder um Zellen einer Vorkultur (ca. 100 µl). Die Nährmedien enthielten zur Selektion ein Antibiotikum.

Dauerkulturen von E. coli

Zur längerfristigen Lagerung transformierter Bakterienkulturen wurde eine Übernachtskultur in Glycerol (Glycerol-Endkonzentration 50 %) in sog. Kryoröhrchen überführt und bei - 80 °C eingefroren.

Transformation kompetenter Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Bei einer Transformation lässt sich fremdes, genetisches Material in Form von Plasmiden in Bakterien einbringen. Unter den anschließend exprimierten Genen befinden sich auch Gene zur Resistenzvermittlung als Marker zur Selektion wodurch der Erfolg der Transformation unter Verwendung eines Antibiotikums bei der anschließenden Kultivierung kontrolliert werden kann. Zellen, die fremde DNA aufnehmen können, werden kompetent genannt und wurden bei - 80 °C gelagert. Direkt vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen aufgetaut. Je 35 µl der XL-1blue Zellen bzw. 50 µl der BL21(DE3) RIPL-Zellen, wurden durch 0,68 µl bzw. 1 µl β-Mercaptoethanol permeabel gemacht. Anschließend wurden die Zellen zunächst 10 min auf Eis inkubiert und mit 2 bzw. 1 µl Plasmidlösung versetzt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock bei 42 °C erfolgte bei XL-1blue-Zellen 45 Sekunden lang, bei BL21(DE3) RIPL-Zellen dauerte er 20 Sekunden. Es folgten weitere 2 min auf Eis. Diese Behandlung induziert einen transienten Zustand der Kompetenz in *E. coli*, wodurch sie in der Lage sind fremdes genetisches Material aufzunehmen. Danach wurden 900 µl, auf 37 °C vorgewärmtes, antibiotikafreies LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese bei 37 °C und 250 rpm für eine Stunde inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden 200 µl auf eine Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert, wobei nach ca. 18 h mehrere Bakterienkolonien auf der Platte zu sehen sein sollten.

Selektion der Bakterienkolonien

Zur Kontrolle, ob die Bakterien das transformierte Plasmid enthalten, wurden eine 4 ml Vorkultur angeimpft indem einige Kolonien mit einer Pipettenspitze von der Platte gepickt wurden. Nach einer Inkubation über Nacht, wurden die Plasmide isoliert und die Plasmid-DNA mit den zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen geschnitten. Anschließend konnte in einem Agarosegel überprüft werden, ob das gewünschte *insert* aus dem Vektor geschnitten werden konnte.

2.2.4 Kultivierung von *Aedes aegypti* Mos20 Zellen

Zur Kultivierung wurden gefrorene Zellen schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, mit 10 ml Mos20 Medium gewaschen und nachfolgend in ca. 10 ml Medium in eine Kulturflasche gegeben. Die Kultur erfolgt bei Raumtemperatur. Ab einer bestimmten Dichte, wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden sie mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und eine neue Flasche mit Zellen inokuliert. Um eine definierte Zellzahl für Experimente zu erhalten, wurde die genaue Zahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für eine längere Lagerung wurden die Zellen nach dem Ablösen mit PBS gewaschen und gezählt. Anschließend wurden Aliquots, die ca. 5×10^6 Zellen enthalten, für 3 min bei 500 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und tropfenweise das Mos20 *freezing* Medium hinzu gegeben. Bevor die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten, wurden sie für zwei Tage zu - 80 °C gegeben.

2.2.5 Tierexperimentelle Methoden

Anästhesie und Blutentnahme von Ratten und Mäusen

Zur Isolation von Parasiten aus dem Blut der Nagetiere, wurde eine möglichst große Menge Blut mittels Herzpunktion den Ratten bzw. Mäusen entnommen. Dazu wurden die Tiere einzeln in einem Glassbehälter mit Diethyläther getränkten Tüchern narkotisiert. Nach 30 bis 60 sec sind die Tiere betäubt und schmerzfrei, sodass die Punktion mit einer heparinisierten Spritze vorgenommen werden konnte. Kleinere Mengen Blut wurden durch eine Punktion der Schwanzspitze der Nager entnommen.

Anästhesie und Injektion von Anopheles-Moskitos

Zunächst wurden weibliche *An. stephensi* Moskitos in Becher portioniert (ca. 50 Tiere / Becher). Zur Narkose wurde Kohlendioxid verwendet. Das Gas wurde mit einem Fluss von 2-3 l / min durch eine poröse Polyethylen-Platte zunächst für etwa 30 sec von oben in den Becher eingeleitet. Nach Einsetzen der Narkose wurden die Tiere für die Injektion aus dem Becher auf die poröse Platte gebracht, die unter einem Binokular platziert wurde. Unter zu Hilfenahme eines Mikroinjektors wurden 69 oder 138 nl seitlich in den Thorax der Moskitos injiziert. Dabei wurde eine maximale Applikationsdauer des Narkosegases von 20 min nicht überschritten, was eine erhöhte Mortalitätsrate der Moskitos zur Folge gehabt hätte. Narkotisierte Moskitos können leicht mit einem feinen Pinsel manipuliert werden ohne Verletzungen davon zu tragen.

2.2.6 Methoden zu *Plasmodium berghei*

Mikroskopische Darstellung des Parasiten mittels Giemsa-Färbung und Bestimmung der Parasitämie

Hierzu wurde einer Maus oder Ratte ein Tropfen Blut durch Schwanzpunktion entnommen, auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Die luftgetrockneten Ausstriche wurden in Methanol fixiert und anschließend in frisch angesetzter Giemsa-Färbelösung (1:10 in VE-Wasser) für 10-30 min gefärbt. Mit VE-Wasser abgespült konnten die getrockneten Ausstriche bei 100facher Vergrößerung am Lichtmikroskop analysiert werden. Die Parasitämie, also der prozentuale Anteil mit *Plasmodium* infizierter Erythrozyten, wird in Prozent angegeben und errechnet sich aus dem Quotienten der Zahl der infizierten und der Zahl der nicht infizierten Erythrozyten x 100. Zu deren Bestimmung wurden infizierte und nicht infizierte Erythrozyten in mindestens 10 neben einander liegenden Gesichtsfeldern ausgezählt.

Mikroskopische Darstellung von Blutstadien mittels Fluoreszenzmikroskopie

Hierzu wurde einem Donortier ein Tropfen Blut durch Schwanzpunktion entnommen und das Blut in RPMI Medium etwa 10fach verdünnt. Etwa 10 μ l dieser Suspension wurden auf einen Objektträger gegeben, ein Deckglas aufgelegt und dieses an den Rändern mit ca. 60 °C warmen Deckglas-Siegelfett versiegelt. Nach dessen Abkühlung konnten die Parasiten am Zeiss Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop examiniert werden. Alle Bilder wurden mit dem bildverarbeitenden Programm *ImageJ* prozessiert.

Transfektion von Plasmodium berghei

Zu Untersuchung der Genfunktion können einzelne Gene gezielt durch homologe Rekombination verändert, ersetzt oder ausgeschaltet werden; eine Methode, die als *gene targeting* bezeichnet wird. Diese Technik wird sowohl in *P. falciparum* als auch in *P. berghei* erfolgreich eingesetzt. Dabei werden jeweils Blutstadien durch Elektroporation transfiziert, sodass die eingeschleusten DNA-Konstrukte ein homologes Rekombinationsereignis induzieren können. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Transfektionen wurden mit dem Elektroporationsgerät *Nucleofactor* und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Da *Plasmodium* während des Großteils des Lebenszyklus haploid ist, kann die Funktion von Proteinen, die nur von einem Gen kodiert werden, mit nur einem Selektionsmarker untersucht werden. Der am häufigsten eingesetzte Selektionsmarker ist das Dihydrofolat-Reduktase/Thymidylat-Synthetase Gen (*dhfr/ts*), welches von *Toxoplasma gondii* abgeleitet wurde (van Dijk *et al.*, 1995; van Dijk *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996). Durch eine Punktmutation an Position 110 von Serin zu Asparagin verleiht *T. gondii* DHFR-TS Resistenz gegenüber Pyrimethamin. Da die Konstrukte eine artfremde *dhfr/ts* enthalten, wird die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination mit der endogenen *P. berghei* *dhfr/ts* minimiert. Des Weiteren scheinen *P. berghei* Parasiten, die das *T. gondii* DHFR/TS-Gen enthalten, 10-100mal resistenter gegenüber Pyrimethamin zu sein als Parasiten mit einem *P. berghei* DHFR/TS-Konstrukt (van der Wel *et al.*, 1997). Das *T. gondii* DHFR/TS-Gen steht unter der Kontrolle

der *P. berghei* DHFR/TS 5' und 3' flankierenden Region (Thathy and Menard, 2002; van der Wel *et al.*, 1997).

Für Transfektionen wurden zunächst *P. berghei* Blutstadien intraperitoneal in Donortiere injiziert. Drei bis vier Tage nach Injektion sollte die Parasitämie zwischen 1 und 3 % liegen. Das Blut der Donortiere, ca. 5 ml, wurde durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommen und zu 10 ml Transfektions-Kulturmedium gegeben, welches 0,25 ml Heparinlösung (200 U / ml) enthielt. Die roten Blutkörperchen wurden bei 1.000 rpm für 8 min sedimentiert und der Niederschlag in 50 ml Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde alles in einen Erlenmeyerkolben überführt, in dem bereits 100 ml erwärmtes Kulturmedium vorgelegt war. Die Kultur wurde in einem Inkubator mit einem Gasgemisch von 10 % O₂, 5 % CO₂, 85 % N₂ bei 37 °C über Nacht für 17 h bei 77 rpm vorsichtig geschüttelt. Während dieser Zeit reifen die meisten Parasiten zu Schizonten, sodass die Kultur am nächsten Tag ein hohes Schizonten / Gametocyten-Verhältnis haben sollte.

Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur gestoppt und die reifen Schizonten mit Hilfe eines Dichtegradienten von den nicht infizierten roten Blutkörperchen getrennt. Dazu wurde die Kultur aufgeteilt und je 35 ml davon in vier 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Diese wurden nun mit je 10 ml einer 55 % Nycodenz / PBS-Lösung unterschichtet. Der so entstandene Gradient wurde für 25 min bei 1.000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildet sich ein Ring aus hauptsächlich mit Schizonten infizierten Erythrozyten zwischen dem Nycodenz / PBS-Gradienten und dem Überstand aus Medium. Der Ring aus Schizonten in der Zwischenphase wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette gesammelt, wobei die Schizonten von je zwei Falcon-Röhrchen vereinigt wurden. Mit Kulturmedium auf ein Volumen von 30 ml aufgefüllt wurden die Parasiten nun für 10 min bei 1.000 rpm sedimentiert. Die resultierenden Schizonten-Niederschläge wurden je nach Volumen in 10-15 ml Kulturmedium vereinigt und nachfolgend zu 1 ml Aliquots in Eppendorf-Gefäße aufgeteilt.

Eines dieser Aliquots enthält ca. 1×10^7 bis 3×10^7 Schizonten und wird für eine Transfektion eingesetzt. Dazu wurden die Parasiten zunächst für ca. 5 sec maximal sedimentiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 100 μ l *human T-cell Nucleofactor* Lösung (Amaxa) resuspendiert; dieser wurde zuvor das DNA-Konstrukt für die Transfektion beigemischt. Pro Transfektion wurden 2-5 μ g DNA in einem Volumen von 5-10 μ l eingesetzt. Die Transfektionskonstrukte wurden zuvor mit entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht vom Rest des Vektors getrennt, durch eine Alkoholfällung der DNA aufgereinigt und in Wasser aufgenommen. Das Gemisch aus Schizonten, *human T-cell Nucleofactor* Lösung und DNA wurde nun in eine Elektroporationsküvette (Amaxa) überführt und diese in das Elektroporationsgerät eingebracht. Für die eigentliche Elektroporation wurde das Transfektionsprotokoll U33 verwendet. Unmittelbar danach wurden 50 μ l Kulturmedium zu den Parasiten pipettiert. Jeweils die Hälfte dieser Suspension wurde dann intravenös in eine NMRI-Maus injiziert.

Am ersten Tag nach der Transfektion wurde die Parasitämie der Tiere mittels Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen untersucht. Während der letzten 24 h konnten die Parasiten einen kompletten Zyklus der asexuellen Teilung ohne Selektionsdruck durch Pyrimethamin durchlaufen. Frühestens 24 h nach der Elektroporation wurde mit der Behandlung begonnen, wobei Pyrimethamin oral über das

Trinkwasser verabreicht wurde. Dazu wurde die Pyrimethamin-Stocklösung 100fach in H₂O verdünnt und der pH-Wert zwischen 3,5 und 5 eingestellt. Mit dem Erscheinen einer resistenten Parasitenpopulation ist 5 bis 8 Tage nach Elektroporation zu rechnen; sie wird als parentale Population bezeichnet. Sobald die ersten resistenten Parasiten im Ausstrich zu sehen waren, wurden diese Parasiten transferiert. Dazu wurde ein Tropfen Blut an der Schwanzvene entnommen, mit ca. 100 μ l PBS verdünnt und intravenös in eine naive Maus injiziert. Stieg auch bei diesen Mäusen unter Pyrimethamin-Behandlung die Parasitämie weiter an, so konnte eine weitere resistente Population isoliert werden, wodurch eine weitere Selektion der Parasiten gewährleistet wurde. Zur Analyse der resistenten Populationen wurde den Tieren ab einer Parasitämie von über 2 % das Blut mittels Herzpunktion entnommen. Üblicherweise wurden zwei Aliquots als sog. Stabilate eingefroren, vom restlichen Blut wurde genomische DNA der Parasiten isoliert (s. unten).

Herstellung von Blutstabilaten

Zur längerfristigen Lagerung von infektiösen Blutstadien wurden Stabilate angefertigt. Dazu wurde nach der Herzpunktion ein Aliquot von 100 bis 300 μ l Blut mit dem zweifachen Volumen an *Plasmodium freezing solution* gemischt und in einem 2 ml Kryoröhrchen direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren. Mit einem solchen Stabilat konnten zu einem späteren Zeitpunkt Mäuse oder Ratten erneut infizieren werden.

Präparation genomischer DNA aus Blutstadien

Zur Trennung der Erythrozyten von anderen Blutzellen wurde das Blut über eine Säule aufgereinigt. Diese setzt sich wie folgt zusammen: In einer Spritze dient etwas Watte als untere Begrenzung. Für das Blut einer Maus wurden 5 ml, für das einer Ratte wurden 20 ml Spritzen verwendet. Darauf wurden Fibrose Cellulose Puder (zum Entfernen der Leukozyten) und Glasperlen (zum Entfernen der Thrombozyten) überschichtet. Zum Equilibrieren wurden die Säulen mehrfach mit 1 x PBS durchgespült. Nun konnte das Blut auf die Säule gegeben werden und durch waschen der Säule mit 1 x PBS konnten die Erythrozyten ausgespült werden. Das Blut einer Maus wurde in 14 ml, das einer Ratte in 50 ml PBS aufgenommen. Nach einer Zentrifugation für 8 min bei 1.500 rpm und Raumtemperatur wurde der Niederschlag zum Aufschließen der Erythrozyten in 0,2 % Saponinlösung resuspendiert. Die freigesetzten Parasiten wurden anschließend für 8 min bei 2.800 rpm und RT zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Danach wurde für 2 min bei 7.000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 200 μ l PBS aufgenommen. Zur Isolation der genomischen DNA aus dem Parasitenniederschlag wurde das *QIAamp DNA Blood Kit* verwendet. Zu den Parasiten wurde Lysepuffer (200 μ l AL-Puffer) und 20 μ l Proteinase K gegeben. Die Lyse und der Abbau der Proteine durch die Proteinase erfolgten für 10 min bei 56 °C. Die freie DNA wurde nun an eine Säule gebunden, durch Zugabe von Waschpuffern (500 μ l AW1; 500 μ l AW2) gewaschen und schließlich in 100 bis 200 μ l Elutionspuffer AE eluiert. Die genomische DNA wurde bei - 20 °C bis zur Analyse durch PCR gelagert.

Klonierung von Plasmodium berghei Blutstadien

Zur Isolierung eines Klons von rekombinanten Parasiten wurde einer Maus mit der entsprechenden Parasiten-Population Blut entnommen, wenn die Parasitämie zwischen 0,1 und 0,5 % lag. Nach genauer Bestimmung der Parasitämie wurde die Anzahl der infizierten Erythrozyten pro μl Blut bestimmt, wobei angenommen wurde, dass 1 μl ca. 7×10^6 Erythrozyten enthält. Dann wurde das Blut so weit in RPMI-Medium verdünnt, dass im statistischen Mittel nur ein Parasit pro 100 μl Ansatz zu finden ist. Diese Ansätze wurden intravenös in NMRI Mäuse injiziert.

Nach ca. 6 Tagen wurde begonnen die Parasitämie der Mäuse mit Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen zu überprüfen. Von diesen Tieren sollten nicht mehr als 40 % positiv werden, denn dann kann davon ausgegangen werden, dass tatsächlich nur ein Parasit pro Maus injiziert wurde. Ab einer Parasitämie von 2 % wurden die Tiere geblutet, Stabiate angefertigt, die genomische DNA der Parasiten isoliert und der Genotyp der Parasiten mittels PCR bestimmt.

Analyse der Exflagellation männlicher Gametocyten

Normalerweise findet die Exflagellation, also die Differenzierung des Mikrogamonten in 4-8 Mikrogameten, im Darm der Mücke statt. Sie kann unter anderem durch einen Temperaturabfall von 2-5 °C induziert werden (Billker *et al.*, 1997). Diese Eigenschaft macht man sich *in vitro* zunutze, indem man die Parasiten aus dem Blut der Maus von 37 °C auf Raumtemperatur bringt. Dazu wurde der Maus durch Schwanzpunktion ein Tropfen Blut entnommen, dieser auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Nach etwa 10 min wurden die Parasiten bei 40facher Vergrößerung auf Exflagellation überprüft. Waren mehr als 3 Exflagellationszentren / Gesichtsfeld zu sehen, wurden die Mäuse als Donortiere für Moskitostadien verwendet.

Ookinetenkultur und Aufreinigung

Für die *in vitro* Kultur von Ookineten wurden 24 h vor der Infektion mit Parasiten Theiler's Original (TO) Mäuse mit Phenylhydrazin (PHZ) behandelt (1,2 mg / Maus). PHZ schädigt Hämoglobin durch eine irreversible Bindung, sodass Sauerstoff nicht mehr gebunden werden kann. Der Verlust großer Mengen von Erythrozyten regt deren Neubildung an. Da *P. berghei* bevorzugt Reticulocyten invadiert, können durch die Behandlung mit PHZ Parasitämien bis weit über 50 % hervorgerufen werden. Die Infektion der PHZ-behandelten Tiere erfolgte durch Transfer von etwa 25 Mio. Blutstadien. Drei bis vier Tage nach der Infektion wurde das Blut auf das Vorhandensein von Gametocyten hin überprüft. Blut wurde durch Herzpunktion entnommen und mit dem zehnfachen Volumen *ookinete complete* Medium vermischt. Nach 18- bis 22stündiger Inkubation bei 20 °C wurde die Kultur in ein 15 ml Gefäß überführt und bei 1.500 rpm für 8 min sedimentiert. Zur Aufreinigung der Ookineten kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz.

Entweder wurde das Pellet zur Lyse der Erythrozyten für 20 min mit eiskaltem Ammoniumchlorid (170 mM) versetzt, anschließend mit HBSS gewaschen und sedimentiert (8 min bei 2.800 rpm). Der Niederschlag und die sich darin befindenden Ookineten wurden in 150 μl *ookinete complete* Medium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung ausgezählt (s. unten). Diese Methode

eignet sich vor allem zur Bestimmung der Gesamtzahl an Ookineten, da wenige Ookineten verloren gehen. Neben den Ookineten werden jedoch auch Blutstadien und Mausleukocyten aufgereinigt.

Wurden möglichst wenig verunreinigte Ookineten benötigt, so wurde die sedimentierte Kultur mit 0,5 ml *ookinete complete* Medium verdünnt, in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und mit 3 μ l magnetischen *dynabeads* versetzt. An diese, mit einem anti-Maus-Antikörper dekorierten Eisenkugeln, wurde zuvor ein Maus-Antikörper gekoppelt. Dieser Antikörper bindet das *P. berghei* P28 Protein, welches auf aktivierten weiblichen Gametocyten, Zygoten und Ookineten exprimiert ist. Der Maus Anti-P28 Antikörper wurde freundlicherweise von Robert Sinden, Imperial College, London zur Verfügung gestellt. Nach sechsminütiger Inkubation auf einem Drehrad bei 10-12 rpm und RT konnten die nun gebundenen Ookineten mit Hilfe eines magnetischen Eppendorf-Gefäßständers aufgereinigt werden. Schließlich wurden die Ookineten in 150 μ l *ookinete complete* Medium resuspendiert und ausgezählt (s. unten). Auf diese Weise aufgereinigte Ookineten sind lediglich mit magnetischen *dynabeads* und einigen aktivierten weiblichen Gametocyten bzw. Zygoten verunreinigt.

Für die Bestimmung der Ookinetenzahl wurden diese in geeigneter Verdünnung (in ddH₂O) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Gesamtzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} & (\text{Anzahl Ookineten in 4 Quadraten} / 4) \times 10 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Anzahl Ookineten} / \mu\text{l} \\ & \text{Anzahl Ookineten} / \mu\text{l} \times \text{Gesamtvolumen der Ookinetensuspension} = \Sigma \text{ Ookineten} \end{aligned}$$

Ookineten Motilitäts Assay

Das Bewegungsmuster von Ookineten wurde mit Hilfe von sog. *time laps microscopy* analysiert. Dazu wurden aufgereinigte Ookineten etwa im gleichen Verhältnis mit Mos20 Zellen gemischt (Siden-Kiamos *et al.*, 2006). Etwa 10 μ l dieser Suspension wurden auf einen Objektträger gegeben, ein Deckglas aufgelegt und dieses an den Rändern mit ca. 60 °C warmen Deckglas-Siegelfett versiegelt. Nach dessen Abkühlung konnten die Ookineten mikroskopiert werden. Im Abstand von 15 Sekunden wurde über einen Zeitraum von ca. einer Stunde eine Serie von Bildern gemacht. Mit Hilfe des bildverarbeitenden Programms *ImageJ* konnte die Strecke ermittelt werden, die einzelne Ookineten von Bild zu Bild zurücklegten und somit auch deren Geschwindigkeit. Dazu wurde das frei erhältliche *Plugin Manual Tracking* verwendet (*ImageJ* - Plugins - Manual Tracking). Nach Angabe des Zeitintervalls und der Umrechnungsfaktors von Pixel in μ m können Fixpunkte (z. B. Vorderende des Parasiten) über die einzelnen Bilder der Serie gesetzt werden. Mit diesen Informationen errechnet das Programm *ImageJ* die von Bild zu Bild zurückgelegte Strecke und die Geschwindigkeit. Für die weitere Auswertung dieser Daten wurde das Programm *Excel* verwendet. Die Umrechnungsfaktoren von Pixel in μ m bzw. umgekehrt sind in Tab. 1 angegeben.

Tab. 1 Übersicht über Umrechnungsfaktoren verschiedener Objektive

Objektiv	1 Pixel entspricht	1 μm entspricht
100 x	0,0645 μm	15,504 Pixel
63 x	0,0984 μm	10,163 Pixel
40 x	0,156 μm	6,41 Pixel
25 x	0,249 μm	4,016 Pixel
10 x	0,627 μm	1,595 Pixel

Infektion von Anopheles-Moskitos mit P. berghei

Zur natürlichen Infektion von *Anopheles*-Weibchen wurde zunächst die Exflagellation von zwei mit *P. berghei* infizierten Mäusen überprüft. Anschließend wurden die Tiere mit Ketamin / Xylazinhydrochlorid narkotisiert und für 20-30 min auf einen Käfig gelegt, in dem sich 2-7 Tage alte Moskitos befanden. Zehn Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit konnte die Infektivität bei der Präparation der Mitteldärme untersucht werden.

Für die Infektion von *An. stephensi* mit *in vitro* kultivierten Ookineten wurde so. Membranfütterungen durchgeführt (Alano *et al.*, 1993). Dazu wurde zunächst ein Wasserbad (Junabo U3) auf 38 °C erwärmt. An eine im Wasserbad integrierte Pumpe wurde dazu genutzt Wasser in einem sog. *glass feeder* zirkulieren zu lassen, wobei diese über Gummischläuche mit der Pumpe verbunden wurden und in Halterungen fixiert waren (Abb. 7).

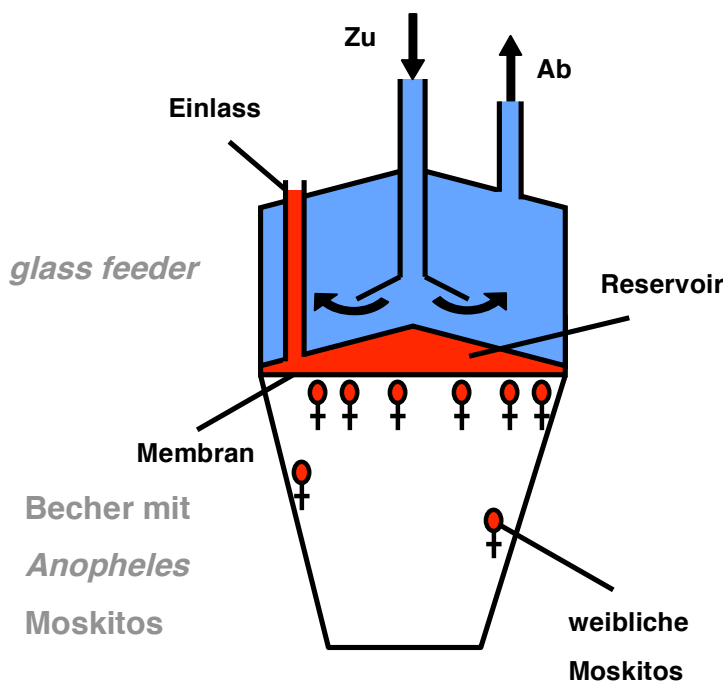


Abb. 7 Schematische Darstellung einer Membranfütterung. Dabei zirkuliert 38 °C warmes Wasser durch einen *glass feeder* und erwärmt dabei dessen gewölbten Boden. Über diesen ist eine Membran gespannt, sodass ein Reservoir entsteht. Dieses Reservoir kann über einen von zwei Einlässen befüllt werden (zweiter Einlass nicht gezeigt). Ist das Reservoir mit der zu fütternden Suspension befüllt wird der *feeder* über einem Becher mit weiblichen *Anopheles* Moskitos positioniert, sodass die Tiere durch die angebrachte Membran stechen und saugen können. Die schwarzen Pfeile geben die Flussrichtung des Wassers an; Zu- und Ablauf sind angedeutet.

Die eingesetzten *glass feeder* besitzen einen gewölbten Boden, der durch den Fluss von Wasser erwärmt werden kann. Über diesen Boden wurde eine Membran gespannt, sodass ein Reservoir entstand. Als Membran dienten frisch abgezogene Mäusefelle. Diese haben gegenüber anderen Membranen, wie z.B. Parafilm, den Vorteil eine hohe Attraktion auf Moskitos auszuüben. Allerdings muss die Innenseite, z.B. mit PBS vor dem Austrocknen bewahrt werden, da sonst kein Blut von den Moskitos aufgenommen werden kann. In dieses Reservoir wurden anschließend die kultivierten und aufgereinigten Ookineten eingefüllt. Hierfür wurde eine definierte Zahl an Ookineten mit 1 ml Blut einer naiven Maus gemischt und diese Suspension mit Hilfe einer Kanüle über einen der beiden Einlässe (zweiter Einlass nicht gezeigt) in das Reservoir gegeben. Anschließend wurde der *feeder* über einem Becher mit weiblichen *Anopheles* Moskitos positioniert, sodass die Tiere durch die angebrachte Membran stechen und saugen konnten (Abb. 7).

Präparation der Moskito-Mitteldärme

Die Bestimmung der Infektivität und der Oocystenzahl pro Mosquito erfolgte durch Entnahme des Mitteldarms weiblicher Mücken. Dazu wurden diese durch einen dreiminütigen Kälteschock auf Eis betäubt und anschließend auf eine Glasplatte mit RPMI-Medium / 3 % BSA gegeben. Für die Präparation der Mitteldärme wurden Kanülen als Präparationsbesteck genutzt. Mit ihnen wurde am ersten abdominalen Segment die Trennung von Abdomen und Thorax durchgeführt und das Abdomen nach hinten abgestreift. Der am Thorax verbleibende Mitteldarm lag nun frei und konnte vom vorderen Teil des Darms abgetrennt werden. Mitteldärme können direkt oder nach zwanzigminütiger Färbung mit einer 0,1 %igen Mercurochrom Lösung lichtmikroskopisch auf Oocysten hin untersucht werden. Diese wurden entweder gezählt (Oocysten / Mitteldarm) oder es wurde die Infektivität bestimmt (prozentualer Anteil der infizierten Mitteldärme). Bilder von infizierten Mitteldärmen wurden am Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M aufgenommen und mit dem bildverarbeitenden Programm *ImageJ* prozessiert.

Präparation der Mitteldarm-assoziierte Sporozoiten

Zur Isolation von Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten wurden zunächst die Mitteldärme wie oben beschrieben am 14. Tag nach der infektiösen Blutmahlzeit in RPMI / 3 % BSA präpariert. Zu diesem Zeitpunkt sind die Oocysten nahezu ausgereift und die ersten Sporozoiten werden ins Hämocoel freigesetzt. Die Mitteldärme wurden in einem Eppendorfgefäß gesammelt und mit einem Mörser homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 4 °C und 1.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Sporozoiten konnten nun abgenommen werden. Darauf hin wurde der Niederschlag mit ca. 150 µl Medium versetzt, erneut homogenisiert und zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils vereinigt.

Präparation von Hämocoel-assoziierten Sporozoiten

Zur Isolation von Hämocoel-assoziierten Sporozoiten kann 15-17 Tage nach einer infektiösen Blutmahlzeit die Hämolymphe von weiblichen Mücken präpariert werden. Dazu wurden die Tiere wie zur Isolation der Mitteldärme narkotisiert. Anschließend wurden den Tieren, einzeln, auf einer Glasplatte die letzten beiden Segmente des Abdomens mit einer Injektionskanüle abgetrennt. Mit einer

fein ausgezogenen Pasteur-Pipette wurden die Moskitos mit RPMI-Medium perfundiert. Dazu wurde die Pipette flach in den seitlichen Thorax eingeführt und ca. 10 μ l durch das Tier gespült. Die am Abdomen austretende Flüssigkeit konnte nun aufgenommen, gesammelt und auf Eis bis zur Verwendung der Sporozoiten gelagert werden. Dies kann ohne weitere Aufbereitung geschehen.

Präparation von Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten

Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten wurden 17 bis 30 Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit isoliert. Entweder wurde dazu dem betäubten Weibchen auf der Seite liegend der Kopf direkt hinter den Augen abgetrennt. Sanften Druck mit einer der Kanülen auf den Thorax lässt den Inhalt des Thorax hervorquellen, in dem sich die Speicheldrüsen befinden. Abgetrennt wurde dieses Material in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß in RPMI-Medium / 3 % BSA gesammelt. Diese Methode der Präparation ist sehr schnell aber unrein. Sollte die Kontamination mit Moskitomaterial möglichst gering gehalten werden, wurde den betäubten Tieren der Kopf abgestreift, sodass die Speicheldrüsen mit dem Kopf aus dem Thorax gezogen werden. Abgelöst vom Kopf wurden die Speicheldrüsen ebenfalls in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß in RPMI-Medium / 3 % BSA gesammelt. Anschließend wurden die Speicheldrüsen mit einem Stößel homogenisiert und für 3 min bei 1.000 rpm sedimentiert. Der Überstand, in dem sich die Sporozoiten befinden, wurde in ein neues Gefäß überführt. Der Niederschlag wurde erneut mit 150 μ l RPMI / 3 % BSA versetzt und ein zweites Mal homogenisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden beide Überstände mit den Sporozoiten vereinigt.

Bestimmung der Sporozoitenzahl

Bei der Bestimmung der Sporozoitenzahl wurde die Anzahl an Sporozoiten pro Weibchen gezählt. Dazu wurde die Sporozoiten-Suspension in geeigneter Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Zahl nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} & (\text{Anzahl Sporozoiten in 4 Quadraten} / 4) \times 10 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Anzahl Sporozoiten} / \mu\text{l} \\ & \text{Anzahl Sporozoiten} / \mu\text{l} \times \text{Vol Suspension} / \text{Anzahl Moskitos} / \text{Infektivität in \%} = \\ & \text{Anzahl Sporozoiten} / \text{Moskito}. \end{aligned}$$

Sporozoiten Motilitäts Assay

Die mikroskopische Analyse der Lokomotion erfolgte in ähnlicher Weise wie die der Ookineten: Sporozoiten wurden in RPMI / 3 % BSA Medium auf einen Objektträger gegeben, ein Deckglas aufgelegt und dieses an den Rändern mit ca. 60 °C warmen Deckglas-Siegelfett versiegelt. Nach dessen Abkühlung konnten die Sporozoiten mikroskopiert werden. Dabei wurden alle drei Sekunden über einen Zeitraum von zwei Minuten Bilder gemacht. Diese Serie von Bildern konnte in Analogie zum Ookineten Motilitäts Assay ausgewertet werden (s. oben). Für Projektionen der Bilderserien wurde die Funktion *Z Projection* verwendet (*ImageJ* - Image - Stacks - Z Projection - Projection type: Standard Deviation).

3. Ergebnisse

3.1 Das *Plasmodium capping protein*

Wie in den Genomen anderer einzelliger Eukaryoten wurden auch in *Plasmodium* nur zwei Gene gefunden, die möglicherweise für die beiden CP Untereinheiten kodieren (Gardner *et al.*, 2002; Schuler and Matuschewski, 2006). Anders als die *P. berghei* CP β Untereinheit (PB000641.00.0), ist die DNA-Sequenz der α Untereinheit nicht vollständig annotiert. In der Datenbank *PlasmoDB* sind für *P. berghei* drei Einträge zum *capping protein* zu finden. Die Einträge PB000351.02.0 und PB300599.00.0 zeigen im Sequenzvergleich jeweils Ähnlichkeit mit den bekannten Sequenzen von CP α Untereinheiten haben (Daten nicht gezeigt). Um die vollständige Sequenz der *PbCP α* zu ermitteln wurde zunächst aus isogenetischen *P. berghei* WT Blutstadien mRNA isoliert und mittels Reverse Transkriptase PCR in cDNA umgeschrieben. Ausgehend von der bekannten CP α cDNA Sequenz von *P. falciparum* wurden Oligonukleotide entworfen, die an den vorhergesagten Start- bzw. Stoppcodon der *P. berghei* Sequenz hybridisieren (DOUBLEexp1+HIS *PbCP α* for_BamHI / DOUBLEexp1+HISPbCP α rev_NotI). Mit diesen Oligonukleotiden konnte dann das *PbCP α* Gen von cDNA amplifiziert, kloniert und sequenziert werden.

Der anschließende Vergleich der kodierenden DNA Sequenz mit der Sequenz der genomischen DNA zeigte, dass *PbCP α* aus neun Exons besteht, die zusammen eine Länge von insgesamt 924 Basenpaaren (bp) ergeben. Auf der genomischen DNA verteilen sich diese Exons über eine Länge von 1904 bp. Diese Sequenzen wurde zur Annotierung an die Datenbank *Genbank* übermittelt und das *PbCP α* Gen erhielt die Identifikationsnummer EU735102. Die vollständigen Sequenzen von genomischer und kodierender DNA sind im App. 8.3 zu finden. Eine schematische Darstellung der Genstruktur von *PbCP α* ist in Abb. 8 zu sehen.

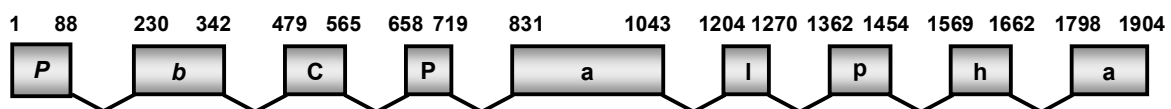


Abb. 8 Schematische Darstellung der Genstruktur von *P. berghei* CP α . Die grauen Kästen symbolisieren die Exons in der genomischen DNA Sequenz von *PbCP α* an. Die Zahlen über den Kästen geben die Position der Exon / Intron Grenzen ebenfalls in der genomischen DNA Sequenz an, wobei 1 das Adenosin des Startcodons markiert.

Das Gen von *P. berghei* CP β besitzt keine Introns und ist 921 bp lang. Um zu überprüfen, dass es sich bei EU735102 und PB000641.00.0 tatsächlich um CP α bzw. β Homologe handelt, wurden die resultierenden Aminosäuresequenzen mit verschiedenen anderen CP's in Abb. 9 verglichen. Dies sind: *Plasmodium falciparum* (*PfCP α* : PFE1420w; *PfCP β* : PFE0880c), *Saccharomyces cerevisiae* (*ScCP α* : X61398, *ScCP β* : X62630), *Gallus gallus* (*GgCP α* : NM_205515, *GgCP β* : NM_205437) und *Homo sapiens* (*HsCP α* : AAH00144, *HsCP β* : AAI09243).

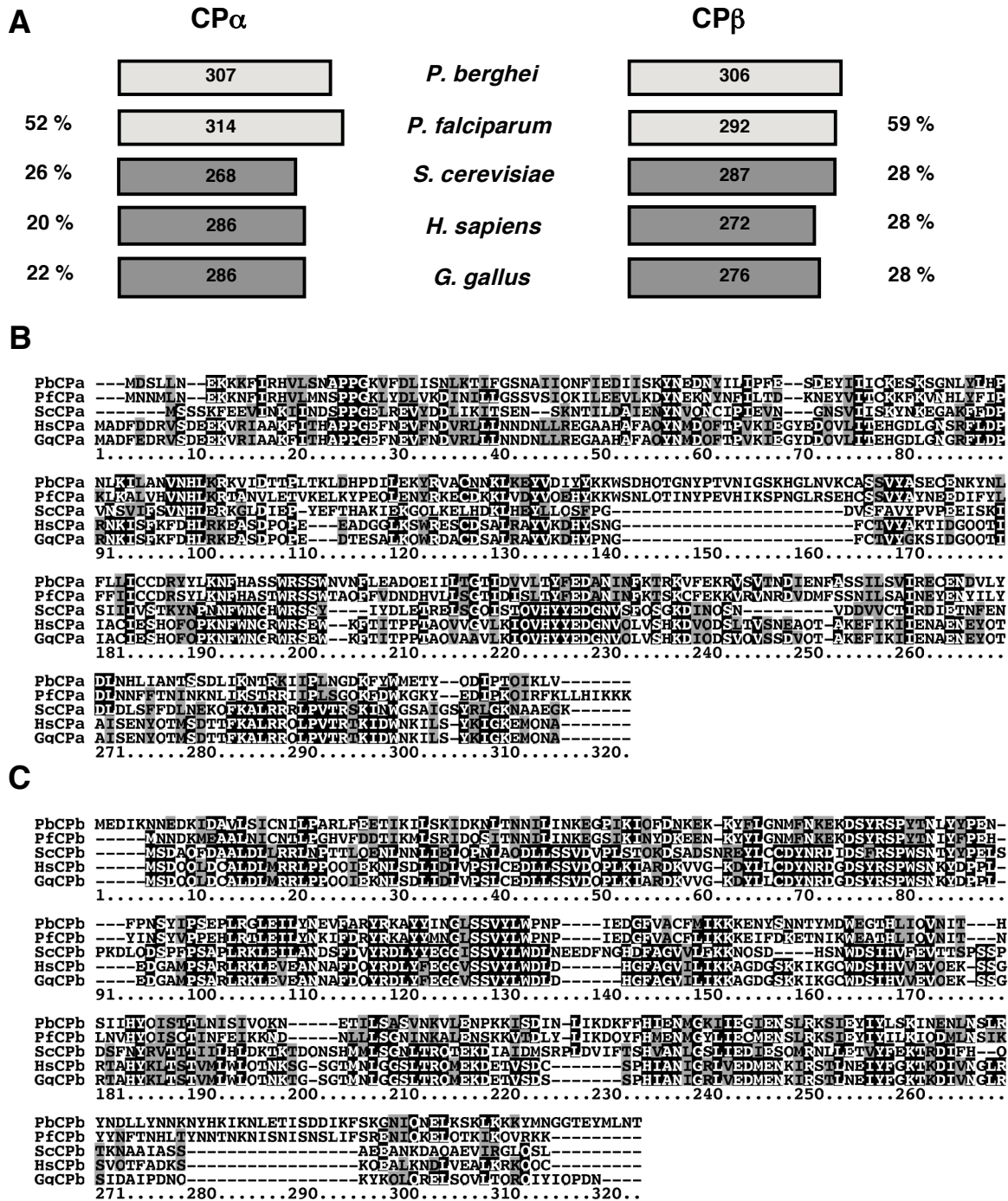


Abb. 9 Schematische Darstellung und Aminosäuresequenzvergleich der CP Untereinheiten verschiedener Organismen. In **A** sind schematisch die Primärstrukturen von *P. berghei* (Pb), *P. falciparum* (Pf), *S. cerevisiae* (Sc), *G. gallus* (Gg) und *H. sapiens* (Hs) CP α und CP β dargestellt. Die Anzahl der identischen Aminosäuren im Vergleich zur *P. berghei* Sequenz sind in Prozent angegeben. Die Länge der jeweiligen Untereinheiten in Aminosäuren ist innen angegeben. In **B** und **C** werden die jeweiligen Primärsequenzen von CP α bzw. CP β verglichen. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, Aminosäuren mit gleichem chemischem Charakter sind grau unterlegt. Der schwarze Balken gibt die Position der Aminosäuren an, die in Abb. 11 verglichen werden (B und C: Zur Verfügung gestellt von Herwig Schüler, verändert nach Ganter *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Bei diesem Vergleich der Primärsequenz stellte sich heraus, dass die jeweiligen *Plasmodium* CP Untereinheiten zu etwa 55 % identisch sind. Im Vergleich zu den CP's von Hefe, Huhn und Mensch konnte jedoch nur eine etwa 25 % Identität der Aminosäuren festgestellt werden (Abb. 9 A).

In der Kristallstruktur von *G. gallus* CP konnten die für die Dimerisierung verantwortlichen Aminosäuren identifiziert werden (Yamashita *et al.*, 2003); dazu gehören: *G. gallus* CP α : Tyr131, Tyr144, Glu236, Asn237, Arg259 und CP β : Tyr107, Tyr120, Glu221, Asn222, Arg244. Trotz des geringen Gesamtgrads an Homologie sind diese Aminosäuren in beiden *Plasmodium* Untereinheiten konserviert. Auch in *Plasmodium* zeigt sich die in der Einleitung erwähnte Symmetrie der beiden Untereinheiten; die genannten Aminosäuren sind sowohl im Vergleich der *Plasmodium* α und β Untereinheit konserviert. Sie sind darüber hinaus aber auch im Vergleich von *Plasmodium* CP α bzw. CP β mit den jeweiligen Untereinheiten der anderen Organismen konserviert. Auch die an der Interaktion mit Actin beteiligten Aminosäuren sind in *Plasmodium* konserviert (Barron-Casella *et al.*, 1995; Narita *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2003), z.B.: *G. gallus* CP β : Leu262, Leu266 (Abb. 9 B / C).

Neben den Indizien aus dem Vergleich der Primärstruktur sollte auch die Sekundär- und Tertiärstruktur analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde überprüft, ob die möglichen *P. berghei* Untereinheiten eine ähnliche Faltung wie das bekannte *G. gallus* CP annehmen können (Yamashita *et al.*, 2003). Unter zu Hilfenahme des Programms SWISS-MODEL (Guex and Peitsch, 1997) konnte ein Homologiemodell des *P. berghei* CP $\alpha\beta$ Heterodimers erstellt werden, welches auf Sequenzvergleichen mit *G. gallus* CP beruht (Abb. 10).

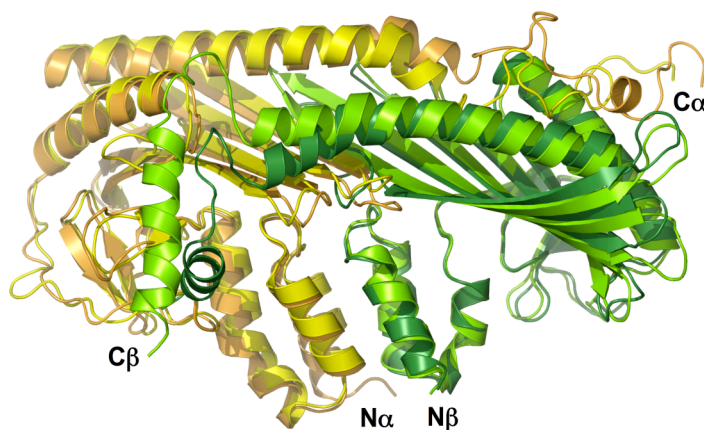


Abb. 10 Homologiemodell des *Plasmodium capping protein*. Gezeigt ist die Superposition eines Modells des *P. berghei* CP Heterodimers auf die Kristallstruktur von *G. gallus* CP. *G. gallus* CP β ist in hellgrün, CP β von *P. berghei* in dunkelgrün gezeigt. CP α von *G. gallus* ist in gold, *P. berghei* CP α ist in gelb dargestellt. Die Positionen der jeweiligen C- und N-Termini sind angedeutet. Zur Verfügung gestellt von Herwig Schüler, verändert nach Ganter *et al.*, unveröffentlichte Daten.

Diese sog. Superposition lässt den Schluss zu, dass *P. berghei* CP eine ähnliche Tertiärstruktur annehmen könnte. Allerdings zeigen die Ergebnisse aus Sequenzvergleich und Modellierung jedoch auch einige wichtige Unterschiede auf. Die *Plasmodium* CP α Untereinheiten besitzen eine Insertion von 23 Aminosäuren etwa in der Mitte der Sequenz, sowie einige weitere kleiner Insertionen und Deletionen (Abb. 9 B). Dieser Teil der *Plasmodium* CP α Untereinheit nimmt wahrscheinlich eine andere Konformation an als im Homologiemodell angedeutet ist. Daher wurde auch von einer Modellierung des *Plasmodium* CP α N-Terminus abgesehen. Außerdem ist der C-Terminus der *Plasmodium* CP β Untereinheiten durch eine Insertion von 17 Aminosäuren etwa doppelt so lang wie die C-Termini anderer β Untereinheiten. Der C-Terminus von *P. berghei* CP β ist darüber hinaus noch durch 9 weitere terminale Aminosäuren verlängert (Abb. 9 C).

Wie bereits erwähnt spielt der C-Terminus der β Untereinheit eine besonders wichtige Rolle für die Bindung an Actin, die von dessen amphipatischen Charakter bestimmt ist (s. 1.3.2). Daher sollte getestet werden ob auch der *P. berghei* CP β C-Terminus amphipatischen Charakter besitzt.

Dazu wurde ein Modell des C-Terminus von *P. berghei* (Aminosäuren 279 bis 294) dem von *G. gallus* (Aminosäuren 253 bis 268) gegenübergestellt (Abb. 11).

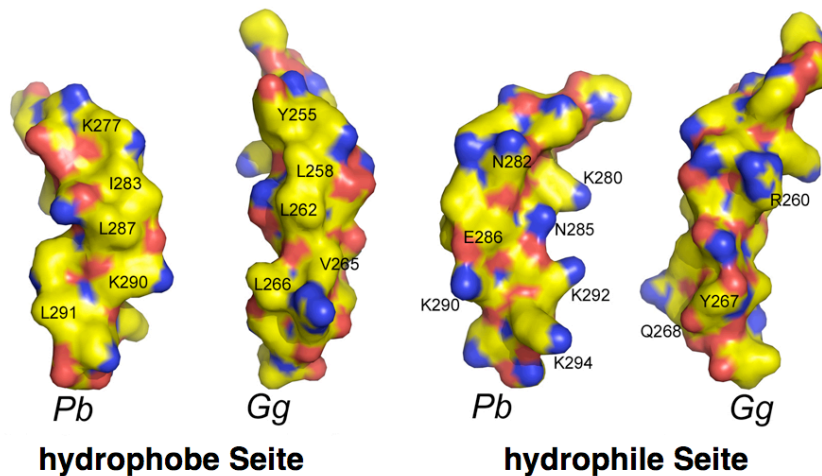


Abb. 11 Vergleich der CP β C-Termini von *P. berghei* (*Pb*) und *G. gallus* (*Gg*). In Gelb sind hydrophobe, in Rot sind saure und in Blau sind basische Bereiche dargestellt. Die Position einiger prominenter Aminosäuren ist angedeutet. In Abb. 9 ist die Position der verglichenen Aminosäuren gekennzeichnet. Zur Verfügung gestellt von Herwig Schüler, verändert nach Ganter *et al.*, unveröffentlichte Daten.

Diese Analyse zeigt, dass auch der β C-Terminus von *P. berghei* einen amphipatischen Charakter besitzt, der mit dem von *G. gallus* vergleichbar ist.

Zusammengenommen untermauern diese Ergebnisse die Annahme, dass es sich bei EU735102 (für *P. berghei* CP α) und PB000641.00.0 (für *P. berghei* CP β) tatsächlich um die beiden CP-kodierenden Gene handelt. Trotz der Unterschiede zu anderen CP's, die wahrscheinlich eine Anpassung an die Struktur von *Plasmodium* Actin darstellen, kann angenommen werden, dass es sich um funktionelle *capping* Proteine handelt.

Als nächstes sollte daher die Transkription von *P. berghei* CP α und β mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) in den motilen und invasiven Stadien untersucht werden. Dazu wurde cDNA aus folgenden Stadien isoliert: Merozoiten, die Erythrozyten invadieren; Ookineten, die den Moskito-Mitteldarm penetrieren und Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten, die durch Gewebe des Nagers migrieren und sich letztlich in der Leber einnisten (s. App. 8.1). Im Anschluss wurde die cDNA mit spezifischer Oligonukleotidkombinationen auf die Anwesenheit von *PbCP α* bzw. *PbCP β* Transkripten hin untersucht. Als Kontrolle diente *MyoA*, von dem bekannt ist, dass es in allen motilen Stadien exprimiert ist. Folgende Kombinationen wurden benutzt: *PbCP α* : *GST α cap for / PbCP α RT rev* (ergibt ein 431 bp Fragment von cDNA und ein 911 bp Fragment von gDNA); *PbCP β* : *PbCP β int forl / revll* (ergibt ein 651 bp Fragment); *PbMyoA*: *PbMyoA forl / revll* (ergibt ein 391 bp Fragment)(Abb. 12).

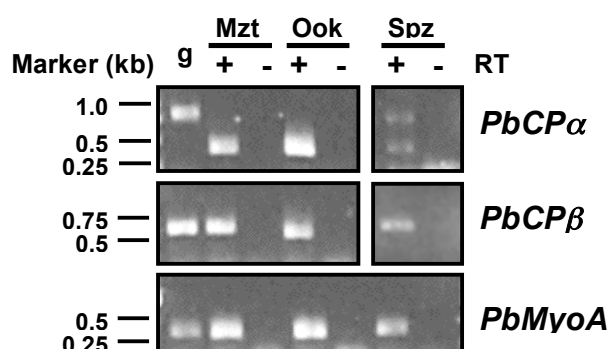


Abb. 12 Phaerogramm der RT-PCR Analyse zur *PbCP* Expression in invasiven Stadien. Mit spezifischen Oligonukleotiden konnten die Transkripte von *PbCP α* und β sowie *PbMyoA* aus cDNA in erwarteter Größe amplifiziert werden und so deren Anwesenheit in Merozoit (Mzt), Ookinet (Ook) und Sporozoit (Spz) nachgewiesen werden (+ RT). In Kontrollreaktionen ohne Reverse Transkriptase (- RT) konnte nichts amplifiziert werden, was eine gDNA Kontamination ausschließt. Als Positiv-Kontrolle diente genomische DNA (g); kb = Kilobasen.

PbCP α und *PbCP β* Transkripte sind erwartungsgemäß in allen invasiven Stadien vorhanden. Auffällig ist jedoch, dass die *PbCP α* Transkripte in Sporozoiten nicht gänzlich gespleißt sind.

3.2 Die zelluläre Rolle von CP β für *P. berghei*

Da die *P. berghei* CP β als *up-regulated in infective sporozoites 17* (UIS17) beschrieben wurde (Matuschewski *et al.*, 2002), versprach die Depletion dieser Untereinheit in erythrozytären Stadien den größten Erfolg. Aus diesem Grund wurde mit der Analyse der *in vivo* Funktion von *PbCP β* begonnen.

3.2.1 Depletion von *PbCP β* in Parasiten

Für die Depletion von *PbCP β* wurde das *P. berghei*-Transfektionssystem genutzt (Menard and Janse, 1997; van Dijk *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1997), mit Hilfe der Reversen Genetik kann die Genfunktion in *P. berghei* analysiert werden. Zunächst wurde zum gezielten Ausschalten des *PbCP β* Gens eine Integrationsstrategie gewählt. Erfolgreiche Integration generiert einen rekombinanten *PbCP β* Locus, der aus zwei unvollständigen und daher nicht funktionellen Kopien des *PbCP β* Gens besteht. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass *PbCP β* keine essentielle Rolle in pathogenen Blutstadien spielt (Ganter, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Depletion *P. berghei* β Untereinheit jedoch eine andere Strategie gewählt, die sog. *replacement*- oder Austauschstrategie. Diese Strategie bietet einige Vorteile im Vergleich zur Integrationsstrategie. Beim *replacement* geht anders als bei einer Integration die komplette genetische Information des Zielgens verloren, was eine Reversion zum Wild Typ (WT) Locus ausschließt. Dies wird dadurch erreicht, dass bei dieser Strategie die 5' und 3' flankierenden DNA-Abschnitte des Zielgens in einen Transfektionsvektor kloniert werden. Anschließend wird der Vektor mit Endonukleasen so geschnitten, dass ein lineares DNA-Konstrukt entsteht, welches mit der 5' flankierenden Region des Zielgens beginnt und mit dessen 3' flankierender Regionen endet. Für die eigentliche Transfektion werden *P. berghei* Blutstadien verwendet, wobei eine Elektroporation den Eintritt in die Zellen ermöglicht. In den Parasiten werden die Schnittstellen der Konstrukte als DNA-Doppelstrangbrüche erkannt, was einen sog. *double-strand-break-repair*-Mechanismus der Zellen auslöst. Dieser hat im günstigsten Fall zwei homologe Rekombinationsereignisse am Locus des Zielgens zur Folge. Auf diese Weise kann das Zielgen durch ein DNA-Konstrukt ausgetauscht werden. Im verwendeten Transfektionsvektor b3D+ befindet unter anderem eine mutierte Form der *T. gondii* Dihydrofolat-Reduktase/Thymidylat-Synthetase Gencassette (*dhfr/ts*). Dieses Gen verleiht Resistenz gegenüber Pyrimethamin und fungiert als Positiv-Selektionsmarker. Da die Konstrukte eine artfremde Dihydrofolat-Reduktase/Thymidylat-Synthetase enthalten, wird die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination mit der endogenen *P. berghei dhfr/ts* minimiert.

Mit spezifischen Oligonukleotidkombinationen wurden der 5' flankierende Bereich (17rep Δ 46forI_SacII / 17rep Δ 46revII_NotI) und der 3' flankierende Bereich (17rep Δ 46forIII_HindIII / 17rep Δ 46revIV_KpnI) des *PbCP β* Gens von genomischer DNA ausgehend amplifiziert und in den Transfektionsvektor b3D+ kloniert. Das entstehende Konstrukt wurde p*PbCP β rep* genannt (Abb. 13).

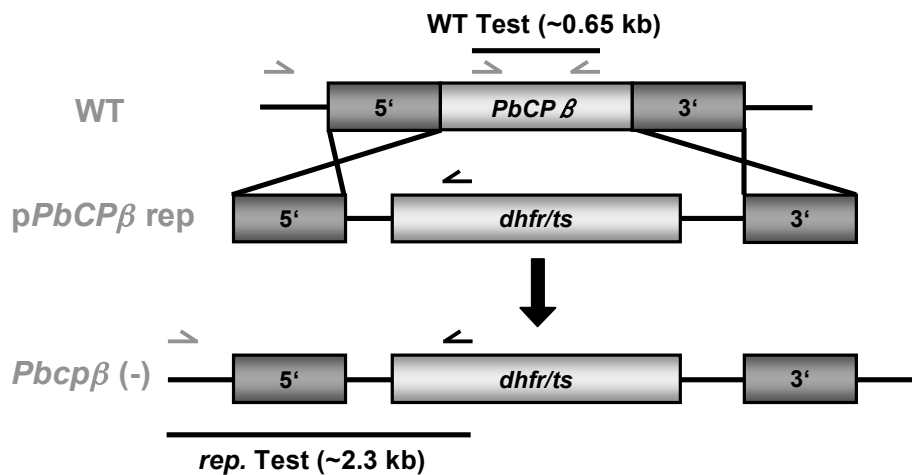


Abb. 13 Illustration der gezielte Depletion des *PbCPβ* Gens mittels *replacement* Strategie. Der Wild Typ (WT) Locus wird nach erfolgreicher homologer Rekombination durch ein linearisiertes DNA-Konstrukt (p*PbCPβ* rep) ausgetauscht. Dieses enthält die 5' und 3' flankierenden Regionen des *PbCPβ* Gens und den *T. gondii dhfr/ts* Positiv-Selektionsmarker. Nach einem doppelten homologen Rekombinationsereignis (schwarzer Pfeil) wird das Zielgen durch den Transfektionsvektor ersetzt. Graue bzw. schwarze Pfeile repräsentieren Oligonukleotide, die im *P. berghei* Genom bzw. im Transfektionsvektor hybridisieren können. WT (WT Test) und *replacement* (rep. Test) spezifische Oligonukleotidkombinationen sind durch Linien angedeutet und die erwarteten Längen der PCR Fragmente sind in Klammern angegeben (kb = Kilobasen).

Nach der Transfektion wurde mit Pyrimethamin selektiert, die genomische DNA der resultierenden, parentalen Parasitenpopulation isoliert und die Parasiten mittels spezifischer PCR-Reaktionen genotypisiert. Folgende Oligonukleotidkombinationen wurden dazu verwendet: WT Test: *PbCPβ* int forI / *PbCPβ* int revII (Fragmentlänge: 651 Basenpaare), sowie *replacement* Test: MGUIS17-forIVtest / b3D+ 3' UTR revIX_EcoRI (Fragmentlänge: 2297 Basenpaare) (Abb. 13). Die Genotypisierung der parentalen Population zeigte, dass es sich wahrscheinlich um eine gemischte Population aus Parasiten *cpβ*(-) und WT Parasiten handelte (nicht gezeigte Daten). Ein solches Ergebnis kann jedoch auch zustande kommen, wenn einzelne Parasiten aufgrund von atypischer Rekombination sowohl den WT als auch den *cpβ*(-) Locus enthalten. Diese Möglichkeit kann jedoch ausgeschlossen werden, wenn beide Genotypen getrennt werden können. Zu diesem Zweck sollte aus der parentalen Population eine klonale Population isoliert werden. Dazu wurde die parentale Population soweit verdünnt, dass im statistischen Mittel nur ein Parasit pro 100 μ l Ansatz zu finden ist. Diese Ansätze wurden intravenös in 15 NMRI Mäuse injiziert. Daraus resultierten sechs Populationen (I₁, I₃, I₅, II₄, III₂, III₄), die anschließend genotypisiert wurden (Abb. 14).

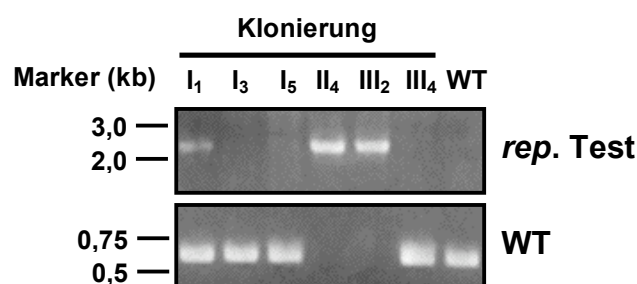


Abb. 14 Phaerogramm der Genotypisierung der *Pbcpβ*(-) Klonierung. Durch eine PCR Reaktion mit einer *replacement*-spezifischen Oligonukleotidkombination (rep. Test) kann nur ein Signal von rekombinanten Locus amplifiziert werden. Die Verwendung einer WT-spezifischen Kombination (WT Test) zeigt, dass in zwei Populationen der WT Locus durch den Vektor ersetzt wurde. Als Kontrolle diente WT genomische DNA (WT). Der Marker zeigt die Größe der Fragmente in Kilobasen (kb).

Wie die Genotypisierung zeigte, gingen aus der Klonierung zwei klonale *cpβ(-)* Linien (II₄, III₂), drei WT Linien (I₃, I₅, III₄) und eine, wahrscheinlich gemischte Population (I₁) hervor. Dadurch konnte auch gezeigt werden, dass es sich bei zwei Linien tatsächlich um *cpβ(-)* Parasiten handelt und nicht etwa um Parasiten die sowohl den WT- als auch den rekombinanten *cpβ(-)*-Lokus enthalten. Zur weiteren Analyse der *cpβ(-)* Parasiten wurde hauptsächlich die klonale Linie II₄ genutzt; eine Verwendung der Linie III₂ wird gesondert erwähnt.

Zur Bestätigung der *CPβ* Depletion wurden im Anschluss poly (A)+ RNA aus *cpβ(-)* und WT Blutstadien isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Es wurden wiederum die bewährten Oligonukleotidkombinationen benutzt (s. Abb. 12). Hierbei sollte überprüft werden ob in den *cpβ(-)* Parasiten noch *CPβ* Transkripte vorhanden sind (Abb. 15).

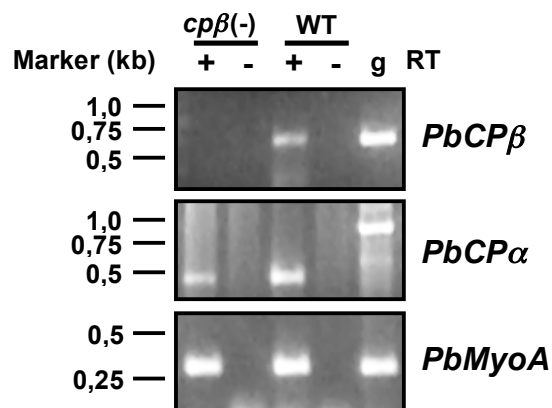


Abb. 15 Phaeogramm einer RT-PCR Analyse zur Überprüfung der *CPβ* Transkriptdepletion in *cpβ(-)* Parasiten. Aus cDNA von *cpβ(-)* und WT Merozoiten konnten mit spezifischen Oligonukleotidkombinationen die Transkripte von *CPβ* und α sowie *MyoA* in erwarteter Größe amplifiziert werden (+ RT). Darüber hinaus scheint die Transkription von *CPα* und *MyoA* in *cpβ(-)* Parasiten nicht beeinträchtigt zu sein. In Kontrollreaktionen ohne Reverse Transkriptase (- RT) konnte nichts amplifiziert werden, was eine gDNA Kontamination ausschließt. Als Positiv-Kontrolle diente genomische DNA (g). Der Marker zeigt die Größe der Fragmente in Kilobasenpaaren (kb).

Diese RT-PCR Analyse bestätigt auf Transkriptebene die Depletion von *CPβ* in *P. berghei* Parasiten. Somit konnte auch gezeigt werden, dass in den rekombinanten Parasiten *CPβ* nicht von einem anderen Locus aus exprimiert wird, der nicht von der Analyse des *CPβ* Locus erfasst wurde.

Zusammengenommen zeigen schon die Ergebnisse aus Genotypisierung und RT-PCR, dass *CPβ* keine essentielle Funktion für die pathogenen Blutstadien besitzt – ein höchst ungewöhnlicher Befund. Bei allen bisher untersuchten *CP*'s waren Funktion und Stabilität des Proteinkomplex abhängig von der Dimerisierung der beiden Untereinheiten (Cooper and Sept, 2008).

Diese genetischen Daten zeigen darüber hinaus, dass eine Untereinheit alleine imstande ist eine möglicherweise vitale Funktion zu übernehmen. Um Einblicke in die spezielle Funktion von *PbCPβ* zu erlangen, wurden *cpβ(-)* Parasiten in allen Stadien des *Plasmodium* Lebenszyklus einer phänotypischen Analyse unterzogen.

3.2.2 *PbcPβ(-)* Parasiten zeigen keinen Defekt in den pathogenen Blutstadien

Nach dieser überraschenden Entdeckung sollte zunächst *in vivo* überprüft werden ob *cpβ(-)*-Parasiten einen Wachstumsdefekt während der asexuellen Proliferation in Blutstadien zeigen. Dazu wurden rekombinante und WT Blutstadien soweit verdünnt, dass im statistischen Mittel nur 1.000 Parasiten pro 100 μ l Ansatz enthalten sind. Anschließend wurden diese Ansätze intravenös in je fünf Mäuse pro Parasiten-Linie injiziert. Die Proliferation der Ausgangspopulation wurde täglich durch die Bestimmung der Parasitämie im Blutausschrieb überwacht (Abb. 16).

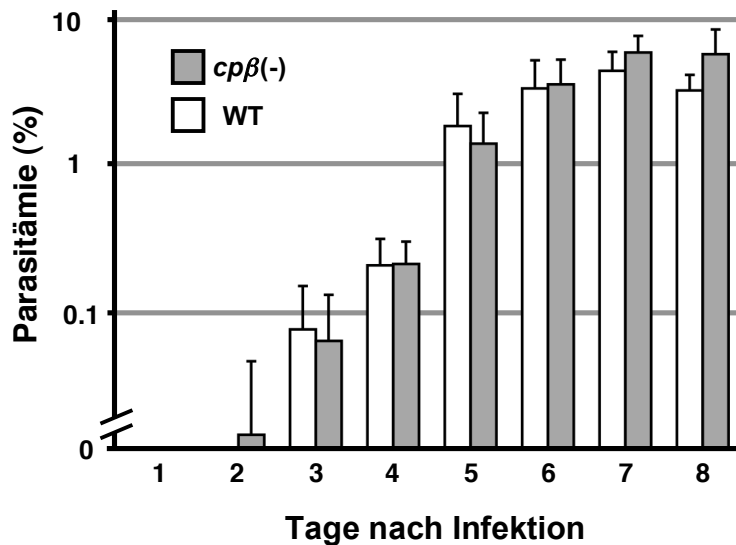


Abb. 16 Graphische Darstellung des Parasitämieverlaufs von WT und *cpβ(-)* Parasiten. Die Entwicklung der Ausgangspopulation von 1000 Parasiten pro Maus wurde täglich in Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen überwacht und die Parasitämie bestimmt. Pro Parasiten-Linie wurden je fünf Mäuse eingesetzt. In grau sind die Ergebnisse der *cpβ(-)* Parasiten; in weiß die des WT's dargestellt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

In diesem *in vivo* Vergleich der Proliferation von WT und rekombinanten Parasiten konnte kein Unterschied der Wachstumsrate ausgemacht werden. Diese Resultate bestätigen, dass CP β keine essentielle Funktion in *Plasmodium* Blutstadien hat. Darüber hinaus zeigen sie aber auch, dass die Rolle von CP β entweder komplementiert werden kann, z.B. durch CP α , oder dass der Verlust von CP β keinen messbaren Einfluss auf die Entwicklung von Blutstadien hat. Ein Phänotyp, der sich nicht in der Proliferationsrate der *cpβ(-)* Parasiten niederschlägt, kann jedoch formal nicht ausgeschlossen werden.

3.2.3 *Pbcpβ(-)* Parasiten formen sexuelle Stadien und Ookineten

Als nächstes wurde getestet ob *cpβ(-)* Parasiten auf den Vektor *Anopheles stephensi* übertragen werden können. Ein Teil der sich asexuell fortpflanzenden Blutstadien entwickelt sich zu Gamonten, aus denen nach der Übertragung auf das Mosquito Gameten entstehen. Dies kann besonders eindrucksvoll bei männlichen Geschlechtszellen beobachtet werden. Diese langen und sehr bewegliche Gameten schlüpfen aus dem Gamont in einem Prozess, der als Exflagellation bezeichnet wird. Die durch die Fusion von weiblichen und männlichen Gameten im Mitteldarm des Moskitos entstehen Zygoten, die sich rasch zu den motilen Ookineten differenzieren (Kooij and Matuschewski, 2007).

Zur Quantifizierung der weiblichen bzw. männlichen Gamonten und für die *in vitro* Kultur von Ookineten wurden die Donortiere zunächst mit Phenylhydrazin behandelt. Nach 24 h erfolgte die intraperitoneale Infektion dieser Mäuse mit 25 Mio. asynchronen Blutstadien. 3-4 Tage nach der Infektion wurde im Giemsa-gefärbten Blutaussstrich die Zahl der Gamonten bestimmt (Tab. 2).

Tab. 2 Anzahl der weiblichen bzw. männlichen Gamonten in *cpβ(-)* bzw. WT Infektionen sowie die Anzahl der daraus resultierenden Ookineten.

	Parasit	weibl. Gamonten (%)	männl. Gamonten (%)	Ookineten (Mio.)	n
Exp.1	<i>cpβ(-)</i>	2,3 ± 1,1	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,2	3
	WT	2,5 ± 0,1	1,6 ± 0,4	3,7 ± 0,6	2
Exp.2	<i>cpβ(-)</i>	2,8 ± 0,3	2,0 ± 1,2	0,5 ± 0,1	3
	WT	1,5 ± 0,7	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,5	3
Exp.3	<i>cpβ(-)</i>	4,8 ± 1,8	1,6 ± 0,8	18,2 ± 12,6	3
	WT	5,6 ± 1,0	0,8 ± 0,2	10,0 ± 4,2	2

In drei unabhängigen Experimenten (Exp.) wurden die jeweiligen Gamonten in Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen von infizierten Mäusen gezählt. Deren Zahl ist als prozentualer Anteil an der Gesamtparasitämie dargestellt. Das gesamte Blut dieser Tiere (je ~1ml) wurde zur *in vitro* Kultur von Ookineten verwendet. Die durchschnittliche Zahl an Ookineten ist in Millionen (Mio.) angegeben (± Standardabweichung; n bezeichnet die Anzahl der eingesetzten Tiere).

Bei der Quantifizierung der Gamonten konnten keine Anzeichen gesammelt werden, die darauf hinweisen, dass die *cpβ(-)* Parasiten in der Entwicklung von sexuellen Stadien eingeschränkt sind. Das Blut dieser Mäuse wurde anschließend für die *in vitro* Kultivierung von Ookineten genutzt. Vor jeder Kultur wurde darüber hinaus das Blut der Donortiere auf Exflagellation hin untersucht. Konnten mehr als 3 Exflagellationszentren pro Gesichtsfeld ausgemacht werden, erfolgte die Kultur. Dazu wurde das Blut mit dem zehnfachen an Kulturmedium gemischt und für 18-22 h bei 20 °C inkubiert. Es zeigte sich, dass rekombinante Parasiten ebenso wie WT Parasiten in der Lage waren *in vitro* Ookineten zu formen. Die Zahl der Ookineten, die ausgehend von 1 ml Blut isoliert werden konnten, schwankte sowohl für *cpβ(-)* als auch für WT Parasiten stark (Tab. 2).

Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass *PbCPβ* weder für die Entwicklung von sexuellen Stadien noch für die Formation von Ookineten eine essentielle Rolle spielt.

3.2.4 Der Verlust von CPβ beeinträchtigt die Infektivität von Ookineten

Im Anschluss sollte die Übertragung der rekombinanten Plasmodien vom Nager auf den *Anopheles* Vektor *in vivo* untersucht werden. Die im Mitteldarm des Moskito geformten Ookineten durchdringen 18-24 h nach der Blutmahlzeit den Mitteldarm des Moskito und entwickeln sich zwischen Darmepithel und Basallamina zur Oocyste, die mikroskopisch leicht zu quantifizieren sind.

Rekombinante Ookineten durchdringen den Moskitomitteldarm nur in geringer Zahl

Für diesen Test wurden Mäuse infiziert und deren Blut auf das Vorhandensein sexueller Stadien hin überprüft. Waren ausreichend viele sexuelle Stadien vorhanden (> 3 Exflagellations-zentren / Gesichtsfeld), wurden die Tiere anästhesiert und auf einen Käfig mit *An. stephensi* Moskito gelegt. Diese konnten dann für 20-30 min Blut saugen. Neben diesen normalen Fütterungen wurden auch *in vitro* kultivierte Ookineten an Moskito gefüttert, wobei die gefütterte Suspension je 2.800 *cpβ(-)* bzw.

WT Ookineten / μl enthielt. Diese Form der Infektion birgt einige Vorteile. So kann sichergestellt werden, dass immer gleiche Mengen an Parasiten in den Moskito gelangen. Mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen Donormäusen kommen so nicht zum tragen. Darüber hinaus kann der Einfluss der peritrophen Membran auf die Infektivität der Parasiten untersucht werden. Nach jeder Mahlzeit bildet der Vorderdarm der Moskito eine chitinhaltige Membran aus, die das aufgenommene Blut umschließt und innerhalb weniger Stunden aushärtet. Wenn statt infiziertem Blut Ookineten gefüttert werden, können diese schon vor der Bildung der peritrophen Membran den Darm durchdringen. Unter normalen Bedingungen kommen Chitinasen des Ookineten zum Einsatz um diese Barriere zu überwinden; sehr viele Parasiten werden jedoch mit dem Blut verdaut. Zehn Tage nach den verschiedenen infektiösen Mahlzeiten wurden die Mitteldärme der Moskitos präpariert, gegebenenfalls mit Mercurochrom angefärbt und auf Oocysten hin untersucht (Abb. 17).

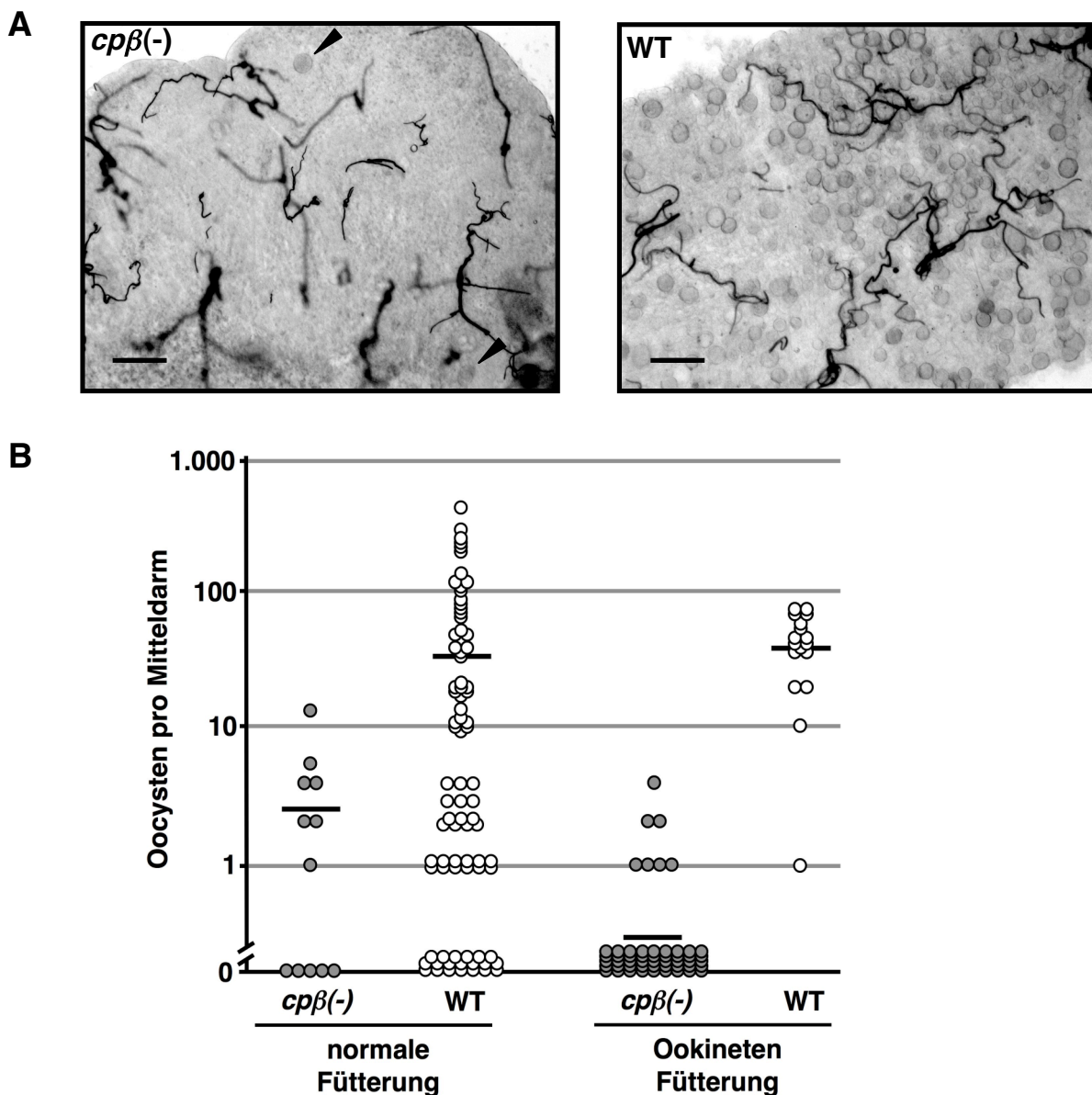


Abb. 17 Mitteldärme von $cp\beta(-)$ und WT infizierten Moskitos und Quantifizierung der Oocystenzahl. A Zehn Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit wurden $cp\beta(-)$ und WT infizierte Mitteldärme präpariert und mit einer 0,1 %igen Mercurochrom-Lösung angefärbt. Bei 100facher Vergrößerung sind Oocysten als sphärische Gebilde zu erkennen. Im linken Bild weisen schwarze Pfeile auf Oocysten. Tracheen sind als schwarze, tubuläre

Strukturen zu erkennen. Die Maßstäbe unten links entsprechen einer Länge von 100 μm . **B** Graphische Darstellung der Oocysten Quantifizierung. Ein Kreis repräsentiert den Oocystenbesatz eines Mitteldarms. Schwarze Balken geben die durchschnittliche Oocystenzahl an. Nach normaler Fütterung wurden 12 $cp\beta(-)$ bzw. 82 WT infizierte Mitteldärme ausgezählt. Nach der Fütterung von Ookineten waren es 52 $cp\beta(-)$ bzw. 17 WT Mitteldärme.

Bei der mikroskopischen Examination fiel sofort die drastische Reduktion der Zahl der $cp\beta(-)$ Oocysten auf. Wie die Quantifizierung der Oocysten pro Mitteldarm ergab, finden sich nach normaler $cp\beta(-)$ Fütterung durchschnittlich 2,8 Oocysten pro Mitteldarm. Wohingegen die Oocystenzahl beim WT mit 44,2 Oocysten pro Mitteldarm etwa das 15fache beträgt. Besonders eindrucksvoll manifestiert sich der $cp\beta(-)$ Phänotyp nach der Fütterung von Ookineten. Nach statistisch gleichem Inokulum, konnten nur 0,3 $cp\beta(-)$ Oocysten pro Mitteldarm gezählt werden; wohingegen nach der Fütterung von WT Ookineten mit 50,6 Oocysten pro Mitteldarm ähnliche Werte wie nach einer normalen Fütterung erreicht wurden. Die mittlere Infektivität der $cp\beta(-)$ Parasiten, also der prozentuale Anteil, der Mitteldärme mit Oocystenbesatz, lag in zehn unabhängigen Fütterungen bei 49 %. Für den WT wurde in 6 Fütterungen eine Infektivität von 76 % festgestellt werden.

Diese Ergebnisse lassen eine Reihe von Schlussfolgerungen zu. Vorab konnten damit die Ergebnisse in denen gezeigt wurde, dass $cp\beta(-)$ keinen Defekt in der Produktion sexueller Stadien und Ookineten haben, bestätigt werden. Wäre beispielsweise die Reduktion von Ookineten der einzige Grund für die verringerte Oocystenzahl, so sollte das gleiche Inokulum die gleiche Zahl von $cp\beta(-)$ bzw. WT Oocysten hervorrufen. Auch scheint die peritrophe Membran nicht die biologische Barriere zu sein, die eine erfolgreiche Kolonisierung des Mitteldarms durch $cp\beta(-)$ Parasiten verhindert. Trotz ihres Fehlens waren die rekombinanten Parasiten nicht in der Lage ähnlich viele Oocysten wie der WT zu bilden. Dennoch können einige wenige Ookineten den Moskitomitteldarm durchdringen und reife Oocysten bilden. Zwar scheinen Ookineten durch den Verlust von CP β stark beeinträchtigt zu sein, eine essentielle Rolle hat es aber in diesem Stadium nicht.

Die Lokomotion von $cp\beta(-)$ Ookineten ist langsamer als die von WT Ookineten

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Fütterungsexperimenten veranlassten die Untersuchung der Migration von Ookineten. Dazu wurden kultivierte WT und $cp\beta(-)$ Ookineten mit *Aedes aegypti* Mos20 Zellen gemischt und mikroskopiert (Siden-Kiamos *et al.*, 2006). Im Abstand von 15 Sekunden wurde über einen Zeitraum von ca. einer Stunde eine Serie von Bildern gemacht. Mit Hilfe des bildverarbeitenden Programms *ImageJ* konnte die Strecke ermittelt werden, die einzelne Ookineten von Bild zu Bild zurücklegten und somit auch deren Geschwindigkeit. Ookineten sind wie *Toxoplasma* Tachyzoiten in der Lage verschiedene Bewegungsformen zu zeigen. Oftmals sieht man sie mit dem posterioren Pol angeheftet während das anteriore Ende einen Kreis beschreibt; eine Bewegungsform die *twirling* genannt wird (Morrissette and Sibley, 2002). Da hierbei keine echte Lokomotion stattfindet wurde diese und ähnliche Bewegungsformen nicht in die Analyse aufgenommen. Häufig konnte an einem einzelnen Ookineten sowohl *twirling* als auch gliding beobachtet werden. In diesen Fällen wurden nur die Abschnitte ausgewertet, in denen eine produktive Lokomotion stattfand. In Abb. 18 A sind Bilder repräsentativer Zeitpunkte verschiedener Serien gezeigt, die zur Ermittlung von

Geschwindigkeitsprofilen einzelner Ookineten angefertigt wurden (Abb. 18 B); die durchschnittlichen Geschwindigkeiten von *cpβ(-)* und WT Ookineten sind in Abb. 18 C graphisch dargestellt.

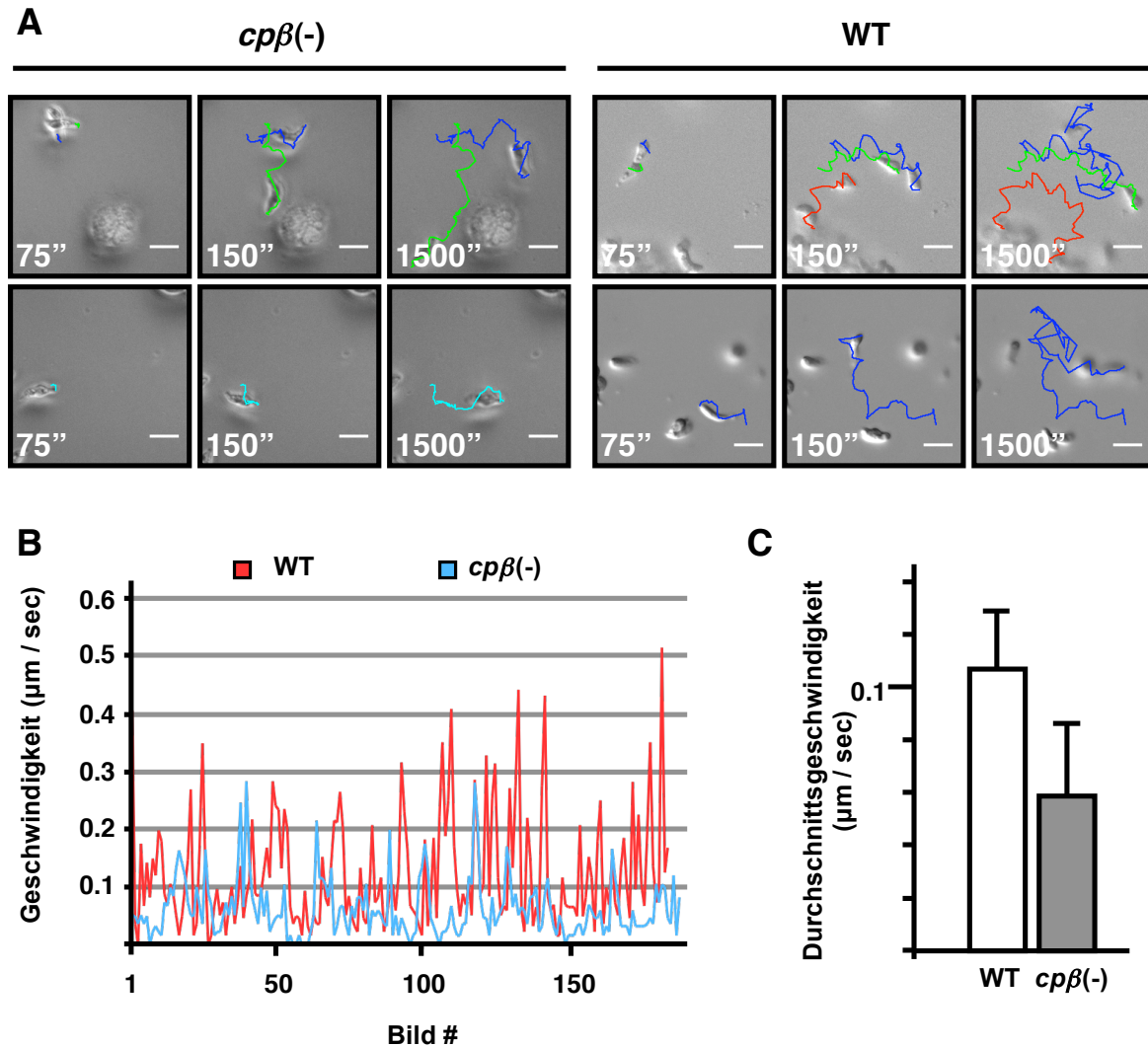


Abb. 18 Quantifizierung der *gliding*-Geschwindigkeit von *cpβ(-)* und WT Ookineten. In **A** sind Bilder repräsentativer Zeitpunkte gezeigt, wobei die von den Ookineten zurückgelegten Strecken mit farbigen Linien markiert sind. Die Maßstäbe unten rechts entsprechen einer Länge von 10 µm. In **B** sind beispielhaft die Geschwindigkeitsprofile je eines *cpβ(-)* (blaue Kurve) und WT (rote Kurve) Ookineten als Funktion der von Bild zu Bild zurückgelegten Strecken gezeigt. Die Bilder wurden im Abstand von 15 sec über einen Zeitraum von ca. einer Stunde aufgenommen. **C** Graphische Darstellung der mittleren *gliding*-Geschwindigkeit von *cpβ(-)* (grau) und WT (weiß) Ookineten; dazu wurden 25 *cpβ(-)* bzw. 12 WT Ookineten analysiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Geschwindigkeiten werden jeweils in µm pro Sekunde (µm / sec) angegeben.

Die geringen *cpβ(-)* Oocystenzahlen deuteten bereits auf einen Defekt im Ookineten hin. Die Bestimmung der *gliding*-Geschwindigkeit bestätigte diese Vermutung. *cpβ(-)* Ookineten können sich zwar produktiv vorwärts bewegen, jedoch mit einer verringerten Geschwindigkeit von $0,06 \pm 0,03 \mu\text{m} / \text{sec}$ im Durchschnitt. WT Ookineten hingegen können etwa doppelt so schnell migrieren. Ihre mittlere Geschwindigkeit lag bei $0,11 \pm 0,02 \mu\text{m} / \text{sec}$, was den bereits publizierten Geschwindigkeiten entspricht (Vlachou *et al.*, 2004). Jedoch zeigen die Geschwindigkeitsprofile einzelner Ookineten, dass auch *cpβ(-)* Ookineten in der Lage sind, kurzfristig ebenso schnell wie WT-Ookineten zu gleiten.

Die Daten aus Fütterungsexperimenten und Quantifizierung der Migrationsgeschwindigkeit von Ookineten deuten gemeinsam betrachtet auf einen subletalen Phänotyp in *cpβ(-)* Ookineten hin. Zwar sind *cpβ(-)* Ookineten zu produktiver Lokomotion imstande, diese ist jedoch langsamer als die von WT Ookineten. Diese Einschränkung führt wahrscheinlich zu der herabgesetzten Zahl an Oocysten und verringerter Infektivität. Dennoch sind einige Ookineten ganz offensichtlich fähig den Mitteldarm zu durchdringen und Oocysten zu bilden. In diesem Stadium des Lebenszyklus erfüllt CPβ wahrscheinlich eine unterstützende Funktion.

3.2.5 *cpβ(-)* Sporozoiten sind nicht fähig den Lebenszyklus im Moskito-Vektor zu vollenden

Rekombinante Parasiten formen Mitteldarm-assoziierte Sporozoiten

Etwa vierzehn Tage nach einer infektiösen Blutmahlzeit haben sich in den Oocysten durch mitotische Teilung, die sog. Sporogonie, mehrere hundert Sporozoiten pro Oocyste gebildet. Diese Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten sind durch geringe Motilität und ein spezifisches Genexpressionsmuster gekennzeichnet; für den Säugetierwirt sind sie nur in sehr hohen Dosen infektiös (Matuschewski, 2006). Im nächsten Schritt der Phänotypisierung der *cpβ(-)* Parasiten sollte daher getestet werden, ob CPβ eine Rolle bei der Bildung von Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten spielt. Für diesen Test erhielten Moskitos zunächst eine infektiöse Blutmahlzeit. Nach vierzehn Tagen wurden die Mitteldärme der Moskitos isoliert und homogenisiert. Größere Fragmente wurden pelletiert und das Homogenat mikroskopisch auf Sporozoiten hin überprüft (Tab. 3).

Es stellte sich heraus, dass die rekombinanten Parasiten trotz der sehr geringen Zahl an Oocysten dennoch eine große Zahl an Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten produzieren können. Die maximale Zahl an Sporozoiten lag bei 30.800 pro Weibchen; die minimale bei 850. Diese enormen Schwankungen werden jedoch auch bei WT Infektionen beobachtet. Im Vergleich zu der dramatischen Reduktion der Oocystenzahl, fällt auf, dass die Reduktion der mittleren Sporozoitenzahl weniger drastisch ausfällt. Diese Ergebnisse stützen eine Hypothese die besagt, dass die Entwicklung von *Plasmodium* im Vektor eine Abhängigkeit zur Parasitendichte zeigt. Demnach besteht eine negative Korrelation zwischen der Sporozoitenzahl pro Oocyste und der Oocystenzahl. Je mehr Oocysten pro Mitteldarm desto weniger Sporozoiten pro Oocyste (Sinden *et al.*, 2007). Vor diesem Hintergrund wird deutlich warum *cpβ(-)* Parasiten imstande sind substantielle Mengen an Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten zu produzieren.

cpβ(-) Sporozoiten zeigen einen dramatischen Defekt bei der Speicheldrüsen Invasion

Nach der Reifung verlassen die Sporozoiten die Oocysten und gelangen ins Hämocoel des Moskitos - ein Prozess der als Oocystenegress bezeichnet wird. Dabei spielt die *egress cystein protease 1* (ECP-1) eine entscheidende Rolle. Sie trägt zur Durchlässigkeit der Oocyste bei (Aly and Matuschewski, 2005). Vom Hämocoel aus gelangen die Sporozoiten an die Speicheldrüsen des Vektors. Diese paarigen Drüsen bestehen aus einem medianen und zwei lateralen Loben. Wie Sporozoiten die

Speicheldrüsen erreichen ist noch unklar. Möglicherweise spielt Chemotaxis eine Rolle (Akaki and Dvorak, 2005). Andere Studien deuten auf einen passiven Transport der Sporozoiten mit dem Hämolympfstrom hin (Rodriguez and Hernandez-Hernandez Fde, 2004). Dort angekommen invadieren Sporozoiten aktiv sekretorische Zellen der Speicheldrüsen, wobei die der beiden lateralen Loben bevorzugt werden. Letztlich gelangen die Sporozoiten in das Lumen der Speicheldrüse. Diese Migration vom Mitteldarm in die Speicheldrüse ist ein aktiver Prozess und darüber hinaus mit einem Reifungsprozess verbunden (Matuschewski, 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Sporozoiten ohne TRAP nicht mehr motil sind und nicht in die Speicheldrüsen gelangen (Sultan *et al.*, 1997). Da TRAP das Substrat mit der Actin / Myosin-Motormaschinerie verbindet, war es besonders interessant zu testen, welchen Einfluß der Verlust eines Actinregulators auf die Invasion der Speicheldrüsen hat. Zu diesem Zweck wurden siebzehn Tage nach der Infektion die Speicheldrüsen von Moskitos präpariert und homogenisiert. Anschließend konnte die Zahl der Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten bestimmt werden (Tab. 3).

Tab. 3 *cpβ(-)* Entwicklung im *Anopheles* Vektor.

Kompartiment	Tag	<i>cpβ(-)</i>	WT
Mitteldarm	14	10.600 ± 9.400 (10)	62.500 ± 25.000 (3)
	17	7.700 ± 3.700 (4)	N.D.
	30	5.400 ± 2.600 (4)	N.D.
Hämocoel	16	120 ± 190 (5)	4.700 ± 5.300 (2)
Speicheldrüsen	17	29 ± 76 (9)	17.050 ± 8.350 (7)
	30	25 ± 27 (4)	N.D.

Für diese Tabelle wurden Daten von beiden klonalen *cpβ(-)* Linien zusammengefasst, da sie sich phänotypisch nicht unterschieden. Angegeben ist jeweils die Zahl an Parasiten pro Weibchen (± Standardabweichung; Tag = Tage nach Infektion; in Klammern: Anzahl der untersuchten Fütterungen N.D. = nicht determiniert).

Diese Analyse zeigte eine außerordentliche Dezimierung der Sporozoiten: In sieben der neun Fütterungen konnten gar keine Speicheldrüsen-assoziierte Parasiten detektiert werden. Nur in zwei Fällen konnten 231 bzw. 32 Sporozoiten pro Weibchen gezählt werden. Um ausschließen zu können, dass es sich bei diesem Phänotyp nicht um eine verzögerte Entwicklung handelt, wurden auch bis zu dreißig Tage nach der Infektion Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten isoliert und quantifiziert (Tab. 3). Dabei konnte keine Zeitabhängigkeit festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt die massive Einschränkung der Parasiten durch die Depletion von CPβ. Es deutet darauf hin, dass *cpβ(-)* Sporozoiten nicht mehr zur Invasion der Speicheldrüsen fähig sind und hier eine Unterbrechung des Lebenszyklus stattfindet.

cpβ(-) Sporozoiten bleiben mit dem Mitteldarm assoziiert

Die Quantifizierung der Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten im *Anopheles*-Vektor warf die Frage nach dem Verbleib der am Mitteldarm gebildeten Sporozoiten auf. Für eine andere Mutante, *s6(-)* Parasiten, konnte ebenfalls ein Defekt in Speicheldrüseninvasion gezeigt werden. Diesen Parasiten fehlt das sporozitenspezifische Transmembranprotein S6, welches wie Proteine der TRAP Familie eine Verbindung zur Motormaschinerie aufbauen kann. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass *s6(-)* Sporozoiten im Hämocoel akkumulieren, wodurch der Phänotyp auf die Speicheldrüseninvasion begrenzt werden konnte; der Oocystenegress schien nicht beeinflusst (Steinbuechel and Matuschewski, 2009).

Um zu testen ob *cpβ(-)* Sporozoiten in dieser Hinsicht einen ähnlichen Phänotyp zeigen, wurde über die Lebensspanne der Moskito hinweg die Zahl an Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten quantifiziert. Darüber hinaus wurden sechzehn Tage nach der Infektion Hämocoel-assoziierte Sporozoiten durch Perfusion des Moskito isoliert und quantifiziert (Tab. 3).

Anders als die *s6(-)* Parasiten akkumulieren die *cpβ(-)* Sporozoiten nicht im Hämocoel. Sie verbleiben vielmehr am Mitteldarm. Auch dreißig Tage nach der Infektion lassen sich größere Mengen an Sporozoiten von diesem Kompartiment des Moskito isolieren.

Diese Daten demonstrieren, dass *cpβ(-)* Parasiten zwar in der Lage sind trotz verminderter Oocystenzahlen eine substantielle Zahl an Sporozoiten zubilden. Nur wenige davon verlassen jedoch die Oocysten und sind in der Hämolymphe zu finden. Diese sind mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mehr fähig in die Speicheldrüsen des Vektors vorzudringen. Vor dem Hintergrund der eingeschränkten *cpβ(-)* Ookineten-Lokomotion deuten diese Resultate zusammengefasst auf einen Defekt der Sporozoitenmotilität hin.

cpβ(-) Sporozoiten zeigen keine produktive gliding motility

Zur Verifizierung dieser Schlussfolgerung sollte im Anschluss die Lokomotion von Mitteldarm- und Hämocoel-assoziierten Sporozoiten analysiert werden. Dazu wurden Mitteldärme an Tag 14 bzw. Hämolymphe am Tag 16 nach der Infektion präpariert und die Sporozoiten isoliert. Die mikroskopische Analyse der Lokomotion erfolgte in ähnlicher Weise wie die der Ookineten: alle drei Sekunden wurden über einen Zeitraum von zwei Minuten Bilder von Sporozoiten gemacht. Diese Serie von Bildern konnte im Anschluss mit Hilfe des bildverarbeitenden Programms *ImageJ* ausgewertet werden. Für diese Analyse wurden vier verschiedene Bewegungsmuster von Sporozoiten definiert: 1. Drifteten die Parasiten über die gesamte Länge der Bilderserie bzw. des Films ohne jemals Kontakt zur Oberfläche aufzunehmen und anzuhafte, so wurden sie als *nicht adhärent* eingestuft; 2. Waren Sporozoiten teilweise oder über die gesamte Länge des Films mit der Oberfläche verbunden ohne jedoch Bewegung zu zeigen, so wurden sie als *adhärent* eingestuft; 3. Bewegten sich angehaftete Sporozoiten auf der Oberfläche, ohne dabei eine Strecke kontinuierlich zurückzulegen, die länger ist als die eigene Körperlänge, so wurde dieses Bewegungsmuster als *nicht produktiv* definiert; 4. Wenn Sporozoiten ohne Unterbrechung eine Strecke zurücklegten, die deren Körperlänge übertraf, wurde sie als *produktiv* gezählt. Zeigten einzelne Sporozoiten mehrere dieser Bewegungsmuster, so wurde

die Bewegung gewertet, die der produktiven Bewegung am nächsten kam; jeder Sporozoit wurde nur einmal in die Analyse aufgenommen. Zur Veranschaulichung der verschiedenen Bewegungsmuster wurden repräsentative Projektionen einzelner Bilderserien erstellt, wobei es sich um Überlagerungen der einzelnen Bilder handelt. Auf diese Weise kann die Positionsänderung des Sporozoiten über die Zeit dargestellt werden (Abb. 19 A). Die Quantifizierung der verschiedenen Bewegungsmuster ist in Abb. 19 B graphisch dargestellt.

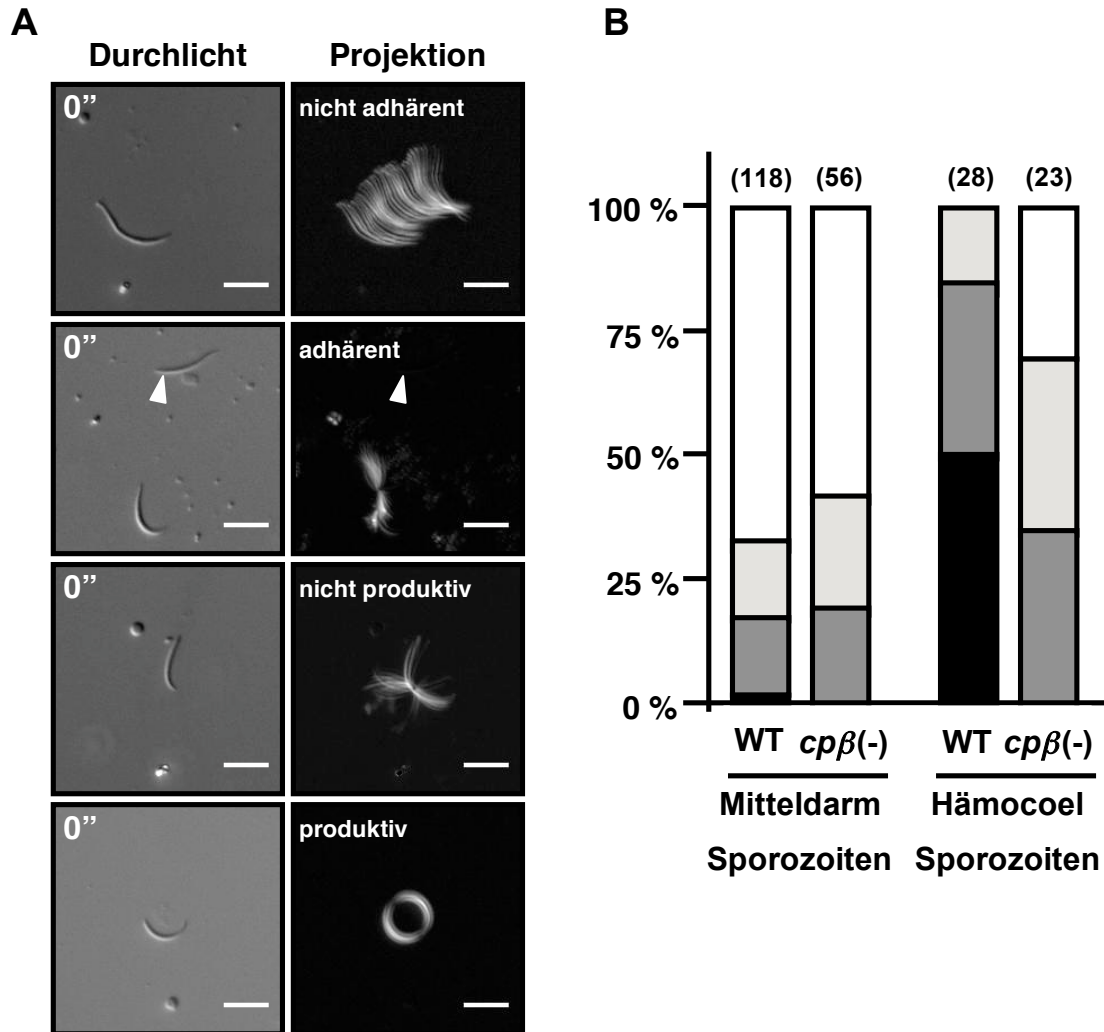


Abb. 19 Quantifizierung der Lokomotion von *cpβ(-)* und WT Sporozoiten. **A** Repräsentative Darstellungen der verschiedenen Bewegungsmuster. Links sind jeweils die ersten Bilder einer Serie zum Zeitpunkt t = 0 Sekunden (0'') im Durchlicht zu sehen. Die Sporozoiten sind als gekrümmte, längliche Strukturen zu erkennen. Rechts sind die Projektionen der verschiedenen Bilderserien zu sehen; nur bewegte Objekte erscheinen hier hell. Die Position eines adhärenen Sporozoiten ist gekennzeichnet (weiße Pfeile), da dieser in der Projektion nicht zu erkennen ist. Die Maßstäbe unten rechts entsprechen einer Länge von 10 μm. **B** Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung verschiedener Bewegungsmuster von *cpβ(-)* und WT Sporozoiten. Der Anteil nicht adhärenen Sporozoiten ist weiß dargestellt, adhärenen Sporozoiten sind in hell grau repräsentiert. Nicht produktiv bzw. produktiv eingestufte Sporozoiten sind dunkel grau bzw. schwarz dargestellt. In Klammern ist die Gesamtzahl der analysierten Parasiten angegeben.

Diese Untersuchung bestätigte die Ergebnisse der verschiedenen experimentellen Fütterungen, die auf eine eingeschränkte Motilität der rekombinanten Sporozoiten hinwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass *cpβ(-)* und WT Sporozoiten vom Mitteldarm sich kaum in ihrer Motilität unterscheiden. Von den analysierten *cpβ(-)* Sporozoiten waren 55 % nicht adhären, 25 % adhären

und 20 % zeigten eine nicht produktive Bewegung. Für den WT konnte folgende Verteilung festgestellt werden: 68 % nicht adhären, 14 % adhären, 17 % bewegten sich nicht produktiv und lediglich 1 % der Mitteldarm-assoziierten WT Sporozoiten zeigte eine produktive Bewegung. Auffällig war jedoch, dass bei den *cpβ(-)* Sporozoiten keine produktive Bewegung festgestellt wurde.

Die Analyse der Hämocoel-assoziierten Sporozoiten ließ dann einen großen Unterschied erkennen. Keiner der *cpβ(-)* Sporozoiten zeigte produktive Lokomotion; je 35 % der *cpβ(-)* Sporozoiten bewegten sich nicht produktiv oder adhärten und weitere 30 % der Parasiten zeigten keine Adhäsion. Dagegen zeigten die WT Sporozoiten eine umgekehrte Verteilung der Bewegungsmuster. Produktive Lokomotion zeigten mit 50 % der größte Teil der Sporozoiten. Weitere 36 % bewegten sich nicht produktiv und nur 14 % waren nur adhärten ohne sich zu bewegen. Ein Anteil von nicht adhärten Sporozoiten, der im Fall von *cpβ(-)* noch immerhin 30 % ausmachte, konnte nicht festgestellt werden.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass das im Lebenszyklus am weitesten fortgeschrittene Stadium der *cpβ(-)* Parasiten, nämlich Hämocoel-assoziierte Sporozoiten, nicht mehr zu produktiver Lokomotion fähig ist; eine Grundvoraussetzung für effektive Invasion der Speicheldrüsen. Auf diese Weise konnten auch die Ergebnisse der Fütterungsexperimente bestätigt werden. Durch die Depletion von CPβ findet eine vollständige Unterbrechung des *Plasmodium*-Lebenszyklus im Sporozoiten-Stadium statt.

cpβ(-) Sporozoiten sind nicht infektiös

Im nächsten Schritt sollten diese Ergebnisse durch Infektionsexperimente bestätigt werden. Dazu wurden zunächst Moskitos mit rekombinanten und WT Parasiten infiziert. Diese wurden dann für eine natürliche Infektion eingesetzt oder die Sporozoiten daraus isoliert und intravenös in Nagetier injiziert. Für natürliche Infektionen erhielten die infizierten Moskitos sieben Tage nach der ersten, für sie infektiösen, eine weitere Blutmahlzeit an C57/bl6-Mäusen oder SD-Ratten, um diese wiederum mit *Plasmodium* auf natürlichem Wege zu infizieren. Beide Nagetier-Stämme sind suszeptibel gegenüber *Plasmodium*-Sporozoiten (Scheller *et al.*, 1994; Vanderberg, 1974). Diese Form des Infektionsexperiments kann eine wichtige Frage beantworten, da schon geringste Sporozoiten-Dosen ausreichen um eine Blutstadieninfektion hervorzurufen (Jin *et al.*, 2007). So kann getestet werden ob einige wenige infektiöse *cpβ(-)* Parasiten in die Speicheldrüsen gelangen und darüber hinaus den Säugetierwirt infizieren können. Letztlich zeigt dieses Experiment, ob *cpβ(-)* Parasiten imstande sind den natürlichen Lebenszyklus zu durchlaufen. Dafür erhielten suszeptible Tiere zwischen fünf und über fünfzig infektiöse Moskitostiche.

Darüber hinaus sollte überprüft werden ob die Unterbrechung des Lebenszyklus allein auf den Defekt in der Invasion der Speicheldrüsen zurückzuführen ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Speicheldrüseninvasion umgangen und zwischen 50.000 und 880.000 Mitteldarm-assoziierte Sporozoiten vierzehn Tage nach der Moskitoinfektion isoliert und in suszeptible Tiere intravenös injiziert. Diese Sporozoiten sind zwar deutlich weniger infektiös als spätere Stadien, waren aber anders als Hämocoel-assoziierte Sporozoiten in größeren Mengen verfügbar. Nach den jeweiligen

Infektionen wurde die Anwesenheit von erythrozytären Stadien täglich in Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen der infizierten Tiere überprüft. Auf diese Weise kann die sog. Präpatenz bestimmt werden; also die Zeitspanne, vom Eindringen eines Erregers bis zum Erscheinen nachweisbarer Stadien (Tab. 4).

Tab. 4 Übersicht der Infektionsexperimente mit *cpβ(-)* Sporozoiten.

A				
Route	Parasit	Anzahl der Moskitos	Präpatenz (Tage)	Anzahl der Tiere
natürliche Infektion	<i>cpβ(-)</i>	5	-	2
		10	-	2
		>50	-	2
	WT	5	4	5

B				
Route	Parasit	Anzahl der Sporozoiten	Präpatenz (Tage)	Anzahl der Tiere
Mitteldarm Spz. iv. Injektion	<i>cpβ(-)</i>	50.000	-	3
		100.000	-	5
		880.000	-	1
	WT	100.000	5	5
		1.000.000	5	2

A Unterschiedlich viele, mit *cpβ(-)* bzw. WT infizierte Moskitos erhielten siebzehn Tage nach deren Infektion eine weitere Blutmahlzeit an suszeptiblen Tieren (C57/bl6 Mäuse bzw. SD-Ratten); deren Blut täglich auf das Vorhandensein von erythrozytären Stadien hin überprüft wurde. **B** Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten wurden vierzehn Tage nach der Moskitoinfektion isoliert, verschiedene Mengen intravenös in suszeptible Tiere injiziert und die Präpatenz wie in A bestimmt. Nach *cpβ(-)* Infektionen konnten keine Blutstadien detektiert werden (-), unabhängig von der Route der Infektion (Spz. = Sporozoiten; iv. = intravenös; WT Kontrolldaten in B wurden durch Daten von Ann-Kristin Müller und Ahmed Aly ergänzt).

In keinem der mit *cpβ(-)* Parasiten infizierten Tiere konnten auch 24 Tage nach der Infektion Blutstadien nachgewiesen werden. Selbst enorme Dosen, wie > 50 infektiöse Stiche oder ~0,9 Mio. Mitteldarm-assoziierte Sporozoiten, vermochten nicht eine Malaria zu etablieren. Die Infektionsexperimente bestätigten also die Unterbrechung des *Plasmodium*-Lebenszyklus nach der Depletion von CPβ. Wahrscheinlich ist nicht nur der Defekt bei der Speicheldrüseninvasion daran beteiligt. *cpβ(-)* Sporozoiten sind für Nager auch direkt intravenös injiziert nicht infektiös, was wahrscheinlich auf mangelnde Motilität und Reife zurückgeführt werden kann (Matuschewski, 2006).

3.2.6 Der *cpβ(-)* Phänotyp kann durch Kreuzung komplementiert werden

Der letzte Teil der phänotypischen Analyse der *cpβ(-)* Parasiten bestand aus Kreuzungsexperimenten. Diese Experimente eignen sich besonders für die Analyse des *cpβ(-)* Phänotyps, da dieser im anophelinen Vektor evident ist. Bei Kreuzungen nutzt man die relativ kurze diploide Phase des *Plasmodium*-Lebenszyklus; sie umfasst nur Zygote, Ookinet und Oocyste. Bereits die Bildung von Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten beinhaltet meiotische Teilungen. Diese Experimente können Aufschluss über die Schwere des CPβ Verlusts geben. Statistisch sollten 50 % der diploiden Stadien heterozygot sein und je ein *cpβ(-)* und ein WT Allel besitzen; homozygote *cpβ(-)* bzw. WT Stadien

sollten mit je 25 % vertreten sein. Durch die Kreuzung und anschließende Infektionsexperimente kann getestet werden inwieweit die Präsenz eines WT-Allels die *PbCPβ* Depletion komplementieren kann. Für eine andere *P. berghei* Mutante konnte eine bereits Komplementation gezeigt werden, diesen Parasiten fehlten sog. LCCL / *lectin adhesive-like proteins* (LAPs)(Raine *et al.*, 2007).

Die Kreuzungsexperimente wurden wie folgt durchgeführt. Zunächst wurden zwei Donortiere im gleichen Verhältnis mit klonalen *cpβ(-)* und isogenetischen WT Blutstadien infiziert. Nachdem das Vorhandensein von sexuellen Parasitenstadien bestätigt wurde, erhielten *Anopheles* Moskitos eine Blutmahlzeit an den anästhesierten Donortieren. Aus den nun infizierten Moskitos wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und von verschiedenen Kompartimenten Sporozoiten isoliert: Mitteldarm-assoziierte Sporozoiten vierzehn Tage nach der Infektion und Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten am Tag 17 und Tag 30. Unmittelbar danach wurden mit diesen Sporozoiten suszeptible SD-Ratten intravenös infiziert; die jeweils eingesetzten Zahlen an Sporozoiten und die Zahl der infizierten Tiere ist aus Tab. 5 zu entnehmen.

Tab. 5 Übersicht der verschiedenen Infektionen nach Kreuzungsexperimenten.

Kompartiment	Tag	Anzahl der Sporozoiten	Präpatenz (Tage)	Anzahl der Tiere
Mitteldarm	14	100.000	6	3
Speicheldrüse	17	100.000	3	2
	30	50.000	5	2

Von links nach rechts angegeben sind: das Kompartiment von dem die Sporozoiten isoliert wurden; der Tag nach der Moskitoinfektion an dem isoliert wurde; die Anzahl der intravenös injizierten Sporozoiten; die Zeit in Tagen bis zur Detektion erster Blutstadien (Präpatenz) und die Zahl der infizierten SD-Ratten.

Nach der Infektion der SD-Ratten mit Tag 14 Mitteldarm- und Tag 17 Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten waren ausreichend viele, d.h. über 1 Mio. Sporozoiten übrig, sodass auch deren genomische DNA für eine Genotypisierung isoliert werden konnte. Darüber hinaus wurde auch von Tag 17 Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten genomische DNA isoliert. Falls keine oder nur eine partielle Komplementation des *cpβ(-)* Phänotyps stattfindet, kann so gezeigt werden ob *cpβ(-)* Sporozoiten zumindest die Speicheldrüsen erreichen. Auch aus den erythrozytären Stadien wurde später die genomische DNA isoliert und zusammen mit der DNA aus Sporozoiten mittels PCR genotypisiert. Der jeweilige Genotyp der Blutstadien, also die Ergebnisse der Kreuzungen sind in Abb. 20 A dargestellt; der Genotyp der eingesetzten Sporozoiten ist in Abb. 20 B gezeigt.

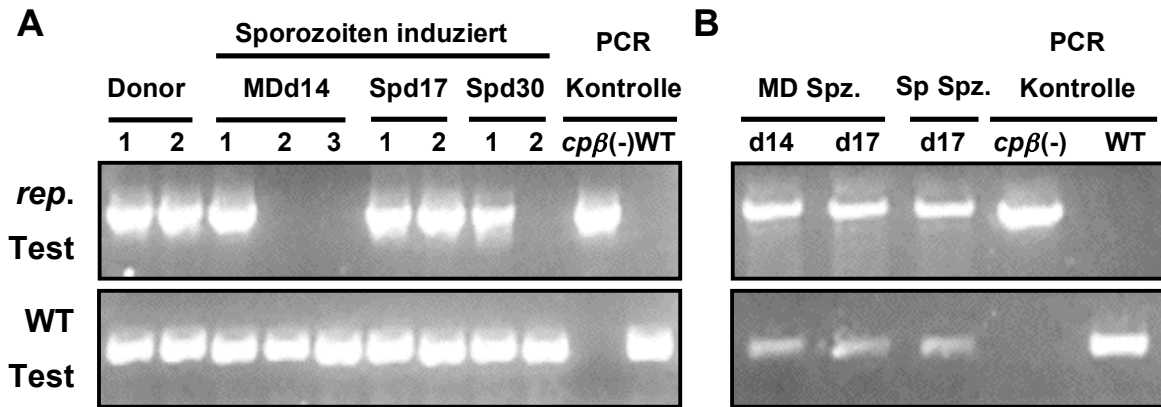


Abb. 20 Phaerogramm der Genotypisierungen nach Kreuzungsexperimenten. Durch PCR Reaktionen mit *replacement*- bzw. WT spezifischen Oligonukleotidkombination (*rep.* bzw. WT Test) wurde der Genotyp der verschiedenen Populationen vor, während und nach dem Kreuzungsexperiment bestimmt. In **A** ist die Genotypisierung der Sporozoiten-induzierten erythrozytären Stadien gezeigt. Der Genotyp der Donortiere ist ganz links zu sehen. Im mittleren Teil sind die Genotypisierungen der Sporozoiten induzierten erythrozytären Stadien gezeigt (von links nach rechts: 3 durch Mitteldarm-assoziierte Sporozoiten (Tag 14) induzierte Populationen und je 2 durch Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten vom Tag 17 bzw. Tag 30 induzierte Populationen). Ganz rechts sind Kontrollreaktionen mit genomischer DNA von klonalen *cpβ(-)* bzw. isogenetischen WT Parasiten aufgetragen. Die Zahlen geben die Nummerierungen der Tiere an. In **B** ist die Genotypisierung der Sporozoiten zu sehen. Von links nach rechts: Tag 14 bzw. Tag 17 Mitteldarm-assoziierte Sporozoiten und Tag 17 Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten. Ganz rechts sind Kontrollreaktionen mit genomischer DNA von klonalen *cpβ(-)* bzw. isogenetischen WT Parasiten aufgetragen (MD = Mitteldarm-assoziierte Sporozoiten; Sp = Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten; d = Tag nach Moskitoinfektion).

Durch die Kreuzungsexperimente konnte eine komplementierende Funktion des WT-Allels in heterozygoten Stadien dargelegt werden. Diese Komplementation ist jedoch nicht immer vollständig. Nur nach der Infektion mit Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten vom Tag 17 war in beiden erythrozytären Populationen sowohl das *cpβ(-)* als auch das WT Allel nachzuweisen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Komplementation bereits bei Mitteldarm-assoziierten Sporozoiten einsetzt und bis spät im Leben des Vektors anhält; denn auch dreißig Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit der Moskitos waren Speicheldrüsen-assoziierten *cpβ(-)* Sporozoiten in der Lage Blutstadien zu etablieren. Dem entsprechend konnte auch in Abb. 20 B dargelegt werden, dass die verfügbaren Sporozoitenpopulationen eine Mischung aus *cpβ(-)* und WT waren.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Kompensation des *cpβ(-)* Phänotyps tatsächlich in heterozygoten, polyploiden Oocysten stattfindet. Die bisherigen Ergebnisse deuten stark auf eine Verminderung bzw. ein Verlust der Lokomotion nach der Depletion von CP β hin. Allerdings könnte in einem andern Szenario das Fehlen von CP β beispielsweise die Funktion von Dynactin einschränken (s. 1.3.4), was möglicherweise die Sekretion von wichtigen Faktoren des Parasiten inhibiert. In einer solchen Situation könnte auch alleine die Anwesenheit des WT fähig sein den *cpβ(-)* Phänotyp zu komplementieren, ohne dass genetischer Austausch in Oocysten erforderlich wäre.

Experimentell kann diese Frage beantwortet werden, indem man die Verpaarung von *cpβ(-)* und WT Parasiten verhindert. Hierzu werden die verschiedenen Parasiten erst nach der Bildung von Zygoten bzw. Ookineten vermischt und in weibliche *Anopheles* Moskitos eingebracht. Die entstehenden Sporozoiten können dann in Analogie zu den Kreuzungsexperimenten für die Infektion

von Tieren genutzt werden. Die Genotypisierung der entstehenden erythrozytären Populationen kann dann Aufschluss über den Erfolg einer Komplementation ohne genetischen Austausch geben.

Um zu gewährleisten, dass gleiche Mengen an *cpβ(-)* und WT Ookineten ins Hämocoel des Vektors gelangen, wurden die Ookineten nicht an Moskitos gefüttert (wie in 3.2.4), sondern direkt in das Hämocoel injiziert. Zu diesem Zweck wurden zunächst *cpβ(-)* und WT Ookineten getrennt voneinander *in vitro* kultiviert. Anschließend konnten weibliche *Anopheles* Moskitos mit Kohlenstoffdioxid-Gas anästhesiert und die Ookineten mikroinjiziert werden. Dazu wurden entweder 500 *cpβ(-)* bzw. WT Ookineten alleine oder eine Mischung aus je 250 *cpβ(-)* und WT Ookineten verwendet. Die direkte Injektion von Ookineten birgt noch einen weiteren Vorteil gegenüber der Fütterung. Da den rekombinanten Parasiten wird die Durchquerung des Mitteldarms erspart wird, kann so getestet werden, ob dies einen Einfluss auf die Entwicklung von *cpβ(-)* Parasiten im Vektor hat. Insgesamt wurden jeweils etwa 100 weibliche Moskitos pro Parasit bzw. Parasiten Mischung injiziert.

Aus den mit *cpβ(-)* Ookineten injizierten Weibchen konnten keine Sporozoiten isoliert werden, weder am Tag 16 aus dem Hämocoel noch am Tag 18 aus den Speicheldrüsen.

Nach der Injektion von WT Ookineten konnten am Tag 16 etwa 280 Hämocoel-assoziierte Sporozoiten pro Weibchen isoliert werden; am Tag 18 wurden rund 1050 Sporozoiten pro Weibchen aus den Speicheldrüsen präpariert.

Am Tag 18 nach der Injektion gemischter Ookineten erhielten zweimal 40 der infizierten Weibchen eine Blutmahlzeit an je einer SD-Ratte, um diese auf natürlichem Weg mit *Plasmodium* zu infizieren. Im Anschluss wurden aus 45 Moskitos die Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten präpariert. Die Zahlen nach der Injektion der *cpβ(-)* / WT Ookineten Mischung lag mit rund 290 Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten pro Weibchen am Tag 18 etwa 3,5fach niedriger als nach der Injektion von WT Ookineten (Hämocoel-assoziierte Sporozoiten wurden nicht präpariert, da die Mortalität der Weibchen höher war als nach *cpβ(-)* bzw. WT Ookineten Injektion). Diese Sporozoiten wurden so aufgeteilt, dass einmal 2.000 und einmal 10.000 der *cpβ(-)* / WT Sporozoiten als Inokulum für die intravenöse Infektion von zwei SD-Ratten dienten.

Nur in einer der auf natürlichem Weg infizierten Ratten konnten erythrozytäre Stadien nachgewiesen werden, wohingegen nach intravenöser Infektion in beiden Tieren Blutstadien zu finden waren. Diese drei Populationen wurden wie für die Kreuzungsexperimente beschrieben genotypisiert (Abb. 21).

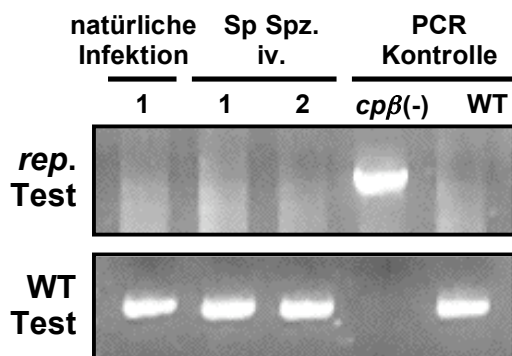


Abb. 21 Phaerogramm der Genotypisierungen nach Ookineten-Injektionsexperimenten. Durch PCR Reaktionen mit *replacement*- bzw. WT spezifischen Oligonukleotidkombination (*rep.* bzw. WT Test) wurde der Genotyp der Sporozoiten-induzierten Populationen bestimmt. Ganz rechts sind Kontrollreaktionen mit genomischer DNA von klonalen *cpβ(-)* bzw. isogenetischen WT Parasiten aufgetragen. Die Zahlen geben die Nummerierungen der Tiere an (Sp = Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten; iv. = intravenöse Infektion).

Wie die Genotypisierung der Sporoziten-induzierten Populationen eindeutig zeigt, fand keine Komplementation des *cpβ(-)* Phänotyps statt. In den Blutpopulationen konnte nur das WT Allel mittels PCR nachgewiesen werden, was die zentrale Bedeutung eines genetischen Austauschs von für die Komplementation unterstreicht.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Injektion von klonalen *cpβ(-)* Ookineten, d.h. die Umgehung der Mitteldarmpassage, keinen Einfluss auf die Entwicklung der rekombinanten Parasiten hat. Dieses Ergebnis unterstützt die bisher gewonnenen Resultate.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass CP β eine essentielle Funktion erfüllt, die auf den anophelinen Vektor beschränkt ist. Die Depletion von CP β führt zu einem subletalen Phänotyp in Ookineten und einem letalen Phänotyp in Sporoziten. Dieser Ausfall konnte jedoch durch ein CP β WT Allel in der diploiden Phase des *Plasmodium*-Lebenszyklus komplementiert werden; einer Phase in der eine heterozygote Zelle mehrere Teilungsphasen durchläuft bevor die haploiden Sporoziten geformt werden. Mit diesen genetischen Daten konnte auch zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine CP Untereinheit alleine in der Lage ist eine vitale Rolle zu erfüllen, denn der Verlust der β Untereinheit zeigt in Blutstadien keinen bzw. einen subpatenten Phänotyp.

3.3 Die zelluläre Rolle von CP α für *P. berghei*

Über unterschiedliche Funktionen von α und β Untereinheit ist bisher nicht viel bekannt. Viele Publikationen zeigen, dass nur ein α/β Heterodimer stabil und funktionell ist (Cooper and Sept, 2008). Die Phänotypisierung der *cpβ(-)* Parasiten ließ jedoch erkennen, dass die *PbCP α* alleine fähig ist, eine vitale Funktion in Blutstadien zu übernehmen; wodurch kein augenscheinlicher Phänotyp verursacht wurde. Erst im anophelinen Vektor führte die Depletion von *PbCP β* zur Unterbrechung des Lebenszyklus. Eine biochemische Analyse von *G. gallus* CP konnte ebenfalls eine Verschiedenheit zwischen α und β Untereinheit feststellen. In dieser Studie wurde der Einfluss der beiden C-Termini auf die Affinität des Dimers zu F-Actin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Verlust des α C-Terminus die Affinität um das 5000fache herabsetzt. Der Verlust den β C-Terminus hingegen führte nur zu einer 300fachen Herabsetzung der Affinität (Wear *et al.*, 2003). Vor diesem Hintergrund war es nun besonders interessant die Rolle der α Untereinheit für *P. berghei* zu analysieren.

3.3.1 *PbCP α* erfüllt eine vitale Rolle in pathogenen Blutstadien

In Analogie zur Analyse der β Untereinheit sollte auch die Funktion von *PbCP α* zunächst mit Methoden der reversen Genetik untersucht werden (s. auch 3.2.1). Wie bereits erwähnt wurde *PbCP α* anders als *PbCP β* nicht als *up-regulated in infective sporozoites* beschrieben (Matuschewski *et al.*, 2002), was eine erfolgreiche Depletion in erythrozytären Stadien unwahrscheinlicher machte.

Aus diesem Grund wurde nicht nur ein *replacement*-Konstrukt (*pPbCP α rep*) wie für *PbCP β* kloniert sondern auch zwei unterschiedliche Konstrukte für eine orthologe Komplementation durch *P. falciparum* CP α . Für diese Konstrukte diente der *replacement* Vektor als Grundvektor (Abb. 22).

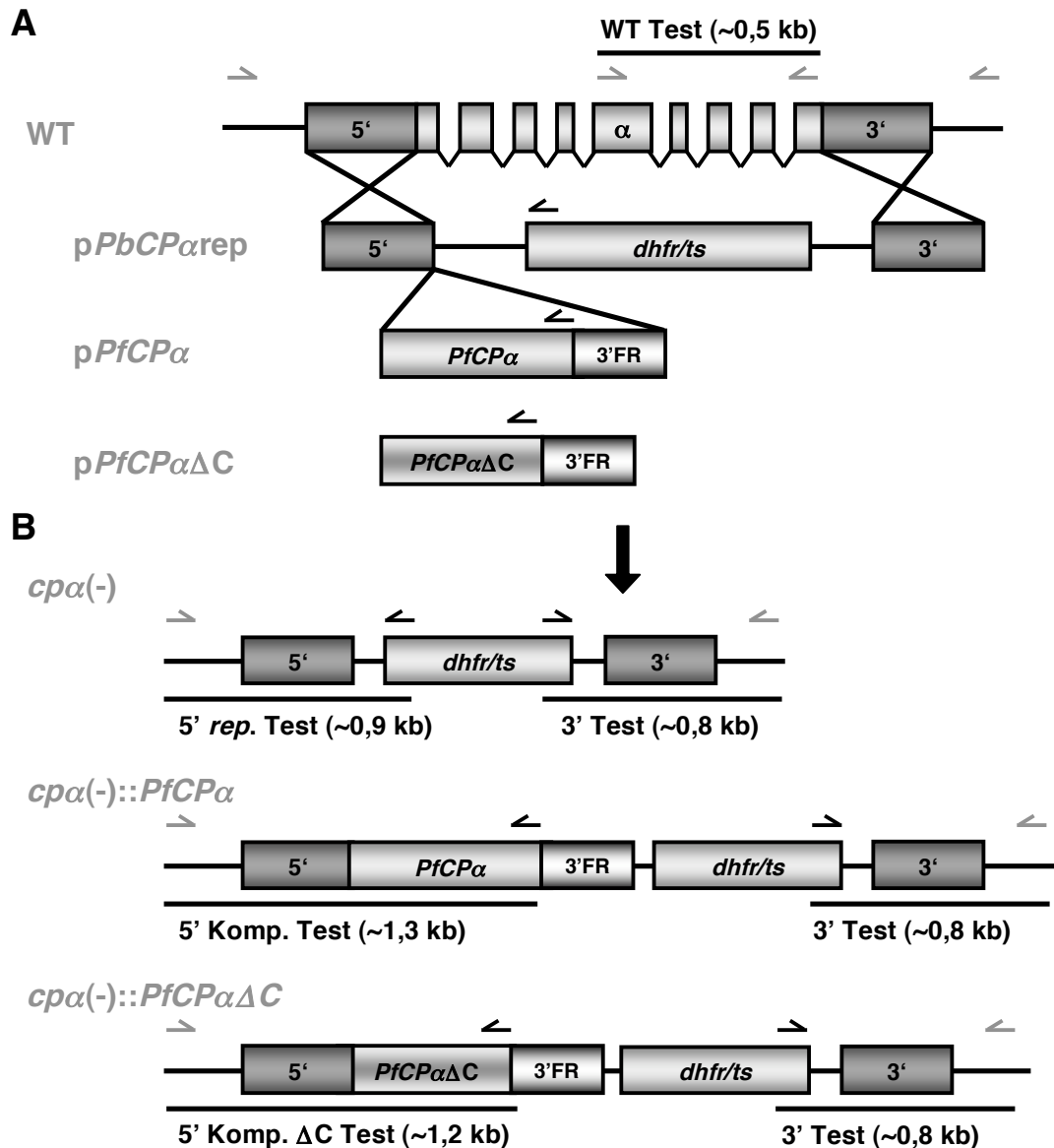


Abb. 22 Schematische Darstellung der gezielten Depletion und Komplementation des *PbCPα* Gens mittels *replacement* Strategie. **A** Der *PbCPα* Wild Typ (WT) Locus wird nach erfolgreicher homologer Rekombination durch unterschiedliche, linearisierte DNA-Konstrukte ausgetauscht. Diese enthalten alle die 5' und 3' flankierenden Regionen des *PbCPα* Gens und den *T. gondii dhfr/ts* Positiv-Selektionsmarker; der Vektor *pPbCPαrep* enthält darüber hinaus keine weiteren DNA-Elemente. *pPfCPα* besitzt des Weiteren eine vollständige Kopie der *P. falciparum* CP α Untereinheit, sowie die 3' flankierende Region der *P. berghei* DHFR/TS (3' FR) um eine exakte Expression zu gewährleisten. Der Vektor *pPfCPαΔC* ist nahezu identisch mit dem letztgenannten, allerdings wurde hier eine C-terminal verkürzte Variante von *PfCPα* in den Vektor kloniert. **B** Nach einem doppelten, homologen Rekombinationsereignis (schwarzer Pfeil) wird das Zielgen durch einen Transfektionsvektor ersetzt, wodurch theoretisch drei rekombinante Loci bzw. drei verschiedene Parasitenlinien entstehen. Dem oberen Locus fehlt *PbCPα* ganz, wodurch eine Depletion von *PbCPα* erreicht würde. Bei den Loci in der Mitte (*cpα(-)::PfCPα*) und unten (*cpα(-)::PfCPαΔC*) ist *PbCPα* durch eine vollständige bzw. eine um 102 Basenpaare C-terminal verkürzte Version von *PfCPα* ersetzt. Auf diese Weise können nach erfolgreicher Transfektion zwei Parasitenlinien generiert werden: In einer ist *PbCPα* durch *PfCPα* ersetzt in der anderen geschieht das gleiche ohne jedoch für den 34 Aminosäuren langen C-Terminus zu komplementieren. Graue bzw. schwarze Pfeile repräsentieren Oligonukleotide, die im *P. berghei* Genom bzw. in den Transfektionsvektoren hybridisiert werden können. WT (WT Test) und *replacement* (5' bzw. 3' Tests) spezifische Oligonukleotidkombinationen sind durch Linien angedeutet und die erwarteten Längen der PCR-Fragmente sind in Klammern angegeben (kb = Kilobasen).

Die 5' und 3' flankierenden DNA Abschnitte zur Induktion homologer Rekombination waren in allen drei Konstrukten identisch. Sie wurden mit folgenden Oligonukleotidkombinationen ausgehend von *P. berghei* genomischer DNA amplifiziert: 5' Region: CP α rep Δ 34forI_SacII / CP α rep Δ 34revII_NotI; 3' Region: CP α rep Δ 34forIII_HindIII / CP α rep Δ 34revIV_KpnI. Durch deren Klonierung in den Transfektionsvektor b3D+ entstand der *replacement*-Vektor pPbCP α rep. Darüber hinaus wurden für die Komplementationskonstrukte folgende DNA-Sequenzen in den *replacement*-Vektor kloniert: Zum einen die vollständige, gespleißte PfCP α Sequenz, wodurch das Konstrukt pPfCP α entstand. Zum anderen wurde eine verkürzte Version von PfCP α in den Vektor integriert. Dieser Variante fehlten die 102 C-terminalen Basenpaare, wodurch eine Verkürzung des Proteins um 34 Aminosäuren erreicht wurde. Diese Verkürzung wurde in Analogie zu oben erwähnten Publikation durchgeführt (Wear *et al.*, 2003). Das so generierte Konstrukt erhielt die Bezeichnung pPfCP α Δ C. Die zusätzlichen DNA-Sequenzen für die Komplementationskonstrukte wurden ausgehend von *P. falciparum* Blutstadien cDNA mit folgenden Oligonukleotidkombinationen amplifiziert: für pPfCP α : CP α rep Δ 34forV_NotI / CP α rep+34revVII_BamHI, bzw. für pPfCP α Δ C: CP α rep Δ 34forV_NotI / CP α rep Δ 34revVI_BamHI. Die beiden letztgenannten Konstrukte wurden so kloniert, dass die jeweiligen *P. falciparum* Gene nach erfolgreicher Transfektion unter der Kontrolle des endogenen *P. berghei* Promotors und der *P. berghei* DHFR/TS 3' flankierenden Region (3' FR) exprimiert werden. Die letztgenannte regulierende Region ist im Vektor b3D+ enthalten. Mit dieser Strategie sollte geklärt werden ob die *P. berghei* CP α Untereinheit für die Entwicklung in Erythrozyten ebenfalls entbehrlich ist und es sollte getestet werden ob PfCP α für die *P. berghei* α Untereinheit komplementieren kann. Des Weiteren kann mit dem pPfCP α Δ C Konstrukt der Einfluss des actinbindenden C-Terminus auf den Erfolg der Komplementation analysiert werden.

In insgesamt drei unabhängigen Experimenten wurde der Vektor pPbCP α rep transfiziert um eine Depletion von PbCP α herbeizuführen. Der Komplementationsvektor pPfCP α Δ C wurde in zwei eigenständigen Transfektionen eingesetzt und der Vektor pPfCP α wurde einmal transfiziert. Aus den parental Populationen wurde im Anschluss die genomische DNA der erythrozytären Parasitenstadien isoliert und mittels PCR genotypisiert. Wie in Abb. 22 B schematisch dargestellt, konnte mit WT bzw. *replacement* spezifischen PCR Reaktionen der Erfolg der Depletion bzw. der beiden Komplementationen überprüft werden. Die zur Genotypisierung verwendeten Oligonukleotidkombinationen sind der Tab. 6 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Abb. 23 dokumentiert.

Tab. 6 Auflistung der zur Genotypisierung der CP α -Parasiten verwendeten Oligonukleotidkombinationen. (bp = Basenpaare).

Test PCR	Oligonukleotidkombination	PCR Fragmentlänge
WT Test	PbCP α RT for / GST α cap rev	510 bp
5' rep. Test	α 5' test / b3D+ revX	911 bp
5' Komp. Test	α 5' test / CP α rep+34 revVII	1339 bp
5' Komp. Δ C Test	α 5' test / CP α rep Δ 34 revVI	1234 bp
3' Test	α 3' test / Tg rev PRO	784 bp

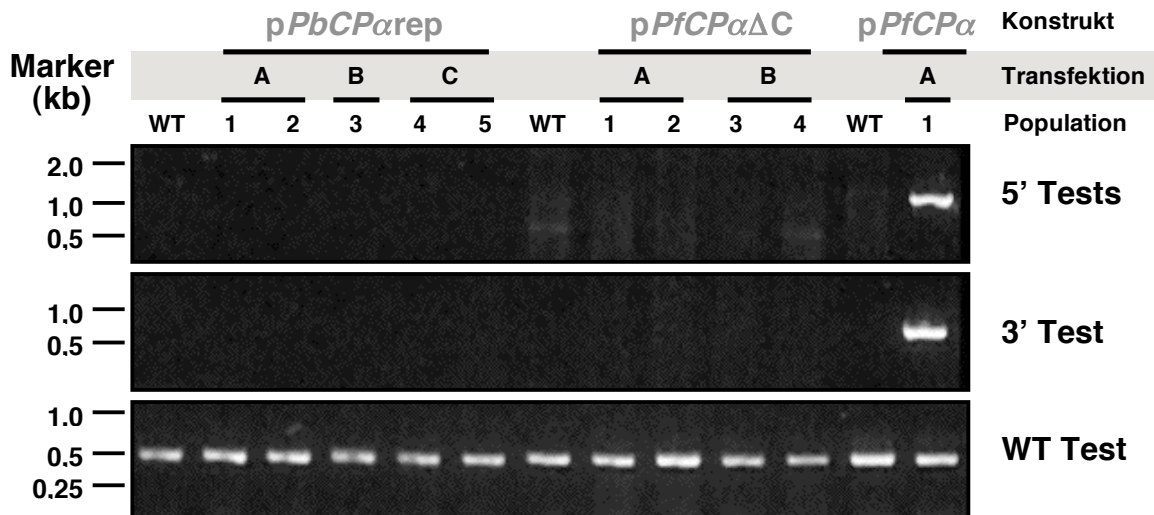


Abb. 23 Phaerogramm der Genotypisierungen nach den verschiedenen *PbCPα* Transfektionen. Summarisch gezeigt sind die Ergebnisse mehrerer Transfektionen. In grau sind die zur Transfektion benutzten Konstrukte repräsentiert; die verschiedenen Transfektionen sind mit A bis C gekennzeichnet und grau unterlegt. Die aus der Transfektion resultierenden parentalen Populationen wurden von 1 bis maximal 5 durchnummeriert. Durch die integrationsspezifischen Oligonukleotidkombinationen 5' *rep.* Test, 5' Komp. Test, 5' Komp.ΔC Test (5' Tests) und 3' Test sowie durch die WT-spezifische Kombination WT Test konnten die parentalen Populationen mittels PCR genotypisiert werden (s. Abb. 22 und Tab. 6). Als Kontrolle diente WT genomische DNA (WT). Der Marker zeigt die Größe der Fragmente in Kilobasen (kb).

Anders als für die β Untereinheit, konnten keine *cpα(-)* Parasiten nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *PfCPα* für *PbCPα* komplementieren kann. Schon nach einer Transfektion konnten rekombinante *cpα(-)::PfCPα* detektiert werden. Diese Komplementation scheint jedoch nur möglich zu sein, wenn auch der C-Terminus der *PfCPα* Untereinheit vorhanden ist. Auch nach zwei unabhängigen Transfektionen konnte die Anwesenheit von *cpα(-)::PfCPαΔC* nicht gezeigt werden. Nach Transfektionen mit den Vektoren *pPbCPαrep.* und *pPfCPαΔC* konnten in den resultierenden Populationen lediglich WT Parasiten nachgewiesen werden.

Da die Komplementation durch *PfCPα* erfolgreich war, kann ausgeschlossen werden, dass der *PbCPα* Locus refraktär gegenüber homologer Rekombination ist. Durch den Gebrauch des gleichen Grundvektors konnte gezeigt werden, dass das Fehlschlagen der anderen Transfektionen nicht technisch bedingt ist. Vielmehr deuteten diese Ergebnisse auf die essentielle Rolle von $CP\alpha$ für erythrozytäre Stadien hin. Diese Funktion ist konserviert zwischen *P. berghei* und *P. falciparum* und ist eng mit der actinbindenden Funktion des C-Terminus verknüpft; fehlt dieser, so ist die komplementierende Funktion von *PfCPα* unterbunden. Darüber hinaus ist die Funktion der α Untereinheit unabhängig vom Vorhandensein der β Untereinheit, den *cpβ(-)* Parasiten sind lebensfähig - umgekehrt gilt dies jedoch nicht! Die β Untereinheit ist alleine nicht fähig die Depletion der α Untereinheit zu kompensieren. Somit konnte zum ersten Mal genetisch gezeigt werden, dass die beiden CP Untereinheiten getrennte Funktionen übernehmen.

3.3.2 Die zelluläre Lokalisation der *Plasmodium α* Untereinheit

Da der *P. berghei* $CP\alpha$ höchstwahrscheinlich eine vitale Aufgabe in Blutstadien zukommt, wurde im Anschluss die Methodik erweitert um die Lokalisierung von $CP\alpha$ in der Zelle zu determinieren. Ähnlich

wie die Depletion lässt auch die Lokalisation von Proteinen Rückschlüsse auf deren Funktion zu. Prinzipiell können Proteine auf verschiedene Weisen visualisiert werden: Die Lokalisation mit Antikörpern bietet den Vorteil einer hohen Spezifität und sie ist in der Lage geringe Mengen nachzuweisen, da es zu einer Multiplikation des Signals kommt. Allerdings muss dazu die Probe abgetötet und fixiert werden. Darüber hinaus ist die Antikörperproduktion langwierig. Für die Lokalisierung können aber auch verschiedene Methoden der reversen Genetik eingesetzt werden, die teilweise mit dem Gebrauch von Antikörpern kombiniert werden. Dabei können beispielsweise Peptide an das gewünschte Protein fusioniert werden, welche ihrerseits mit Antikörpern sichtbar gemacht werden. Eine Methode, die den Gebrauch von Antikörpern und damit die Fixierung von Proben umgeht, ist die Fusion eines fluoreszierenden Proteins an das Zielprotein. Auf diese Weise kann die Lokalisation eines Proteins direkt in der lebenden Zelle analysiert werden kann. Diese schnelle Methode zur Visualisierung birgt ihrerseits Nachteile. Das fluoreszierende Fusionsprotein kann toxisch für die Zelle sein und geringe Mengen des Zielproteins sind schwer zu detektieren.

Trotz dieser möglichen Nachteile wurde die letztgenannte Methode für die Lokalisation von $CP\alpha$ genutzt, denn die Möglichkeit zur Untersuchung von lebenden oder gar motilen Parasiten überwog die nachteiligen Eigenschaften. Zur Visualisierung von $CP\alpha$ wurde daher der *replacement*-Vektor *pPbCP α rep* als Ausgangskonstrukt gewählt. Wie sich gezeigt hat ist der α C-Terminus wichtig für die Funktionalität des gesamten Proteins. Aus diesem Grund wurde die kodierende DNA Sequenz des rotfluoreszierenden Proteins mCherry vor das 5' Ende von *PfCP α* kloniert und somit das Protein N-terminal fusioniert (Shu *et al.*, 2006). Für die Amplifikation der *mCherry*-Sequenz wurden folgende Oligonukleotide verwendet: mCherry forI_NotI / mCherry revII_SpeI. Außerdem wurde das endogene Startcodon von *PfCP α* während der Klonierung des Konstrukts eliminiert, sodass eine Expression nur als Fusionsprotein stattfinden sollte. (Abb. 24).

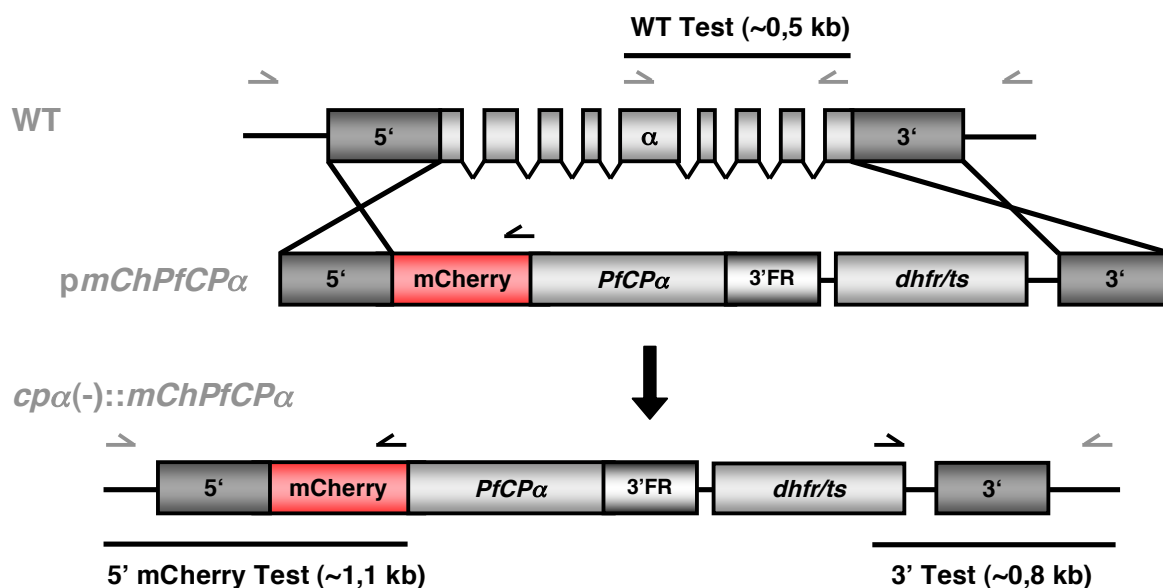


Abb. 24 Illustration der Strategie zur Visualisierung von $CP\alpha$. Der *PbCP α* Wild Typ (WT) Locus wird nach erfolgreicher homologer Rekombination durch das linearisierte DNA-Konstrukt *pmChPfCP α* ausgetauscht. Dieses enthält die 5' und 3' flankierenden Regionen des *PbCP α* Gens und den *T. gondii dhfr/ts* Positiv-Selektionsmarker. Darüber hinaus enthält der Vektor eine Fusion der kodierenden DNA-Sequenzen des rotfluoreszierenden Proteins

mCherry und *PfCP α* sowie die 3' flankierende Region der *P. berghei* DHFR/TS (3' FR) um exakte Expression zu gewährleisten. Nach einem doppelten, homologen Rekombinationsereignis (schwarzer Pfeil) wird das Zielgen *PbCP α* durch den Transfektionsvektor *pmChPfCP α* ersetzt, wodurch der rekombinante Locus *cp α (-):mChPfCP α* entsteht. Graue bzw. schwarze Pfeile repräsentieren Oligonukleotide, die im *P. berghei* Genom bzw. im Transfektionsvektor hybridisieren können. WT (WT Test) und *replacement* (5' mCherry bzw. 3' Test) spezifische Oligonukleotidkombinationen sind durch Linien angedeutet und die erwarteten Längen der PCR-Fragmente sind in Klammern angegeben (kb = Kilobasen).

Anders als für die bisherigen Experimente, wurde für diese Transfektion nicht der *P. berghei* Stamm NK65 verwendet, sondern der sog. GFP-507cl Klon des letalen ANKA Stamms. Parasiten dieser klonalen Linie exprimieren in ihrem Cytosol das *green-fluorescent protein* (GFP) unter der Kontrolle des EF1 α Promotors. Da der Transfektionsvektor in einen sog. *ssu rRNA* Locus integriert wurde, sollte die Expression anderer Gene nicht beeinflusst werden (Janse *et al.*, 2006). Als Selektionsmarker zur Klonierung dieser rekombinanten Parasiten wurde nur die GFP-Expression genutzt. Daher konnte die Selektion auf *cp α (-):mChPfCP α* Parasiten in Analogie zu den bisherigen Transfektionen mit Pyrimethamin durchgeführt werden. Anschließend wurde die genomische DNA der vier resultierenden Parasitenpopulationen isoliert und mittels PCR genotypisiert. Dabei kamen folgende, in Abb. 24 angedeuteten, Oligonukleotidkombinationen zum Einsatz: WT-Test: *PbCP α* RT for / GST α cap rev_NotI (ergibt ein 510 bp Fragment); 5' mCherry Test: α 5' test / mCherry revII_Spel (ergibt 1102 bp Fragment) und 3' Test: α 3' test / Tg rev PRO (ergibt ein 784 bp Fragment). Die Ergebnisse der Genotypisierung der parentalen Populationen sind in der Abb. 25 dargestellt.

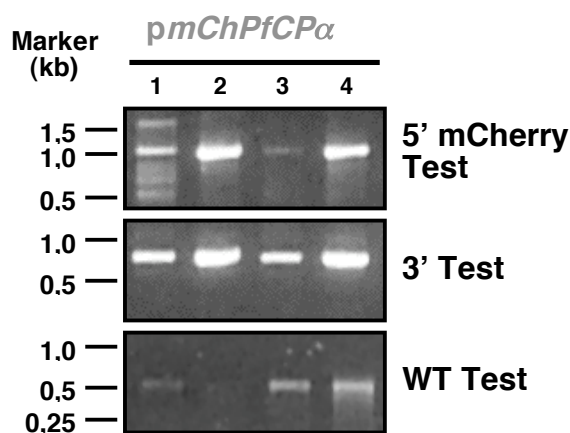


Abb. 25 Phaerogramm der Genotypisierung nach der *pmChPfCP α* Transfektion. Durch eine PCR Reaktion mit den *replacement*-spezifischen Oligonukleotidkombinationen 5' mCherry Test und 3' Test kann nur ein Signal von einem rekombinanten Locus amplifiziert werden. Die Verwendung der WT-spezifischen Kombination (WT Test) ermöglicht den Nachweis des WT Locus. In allen vier Populationen konnten sowohl rekombinante als auch WT Loci nachgewiesen werden. Der Marker zeigt die Größe der Fragmente in Kilobasen (kb).

Bereits nach der ersten Transfektion konnte in den vier resultierenden Populationen der rekombinante *cp α (-):mChPfCP α* Locus nachgewiesen werden; die Genotypisierung zeigt deutliche Signale für beide *replacement*-spezifischen PCR-Ansätze.

Die erste Untersuchung der CP α Lokalisation erfolgte im Anschluss mit der Population 2, da diese starke *replacement*-spezifische Signale zeigt und da sie nur ein schwaches WT-spezifisches Signal vorweist. Für die mikroskopische Analyse wurden zunächst Donormäuse infiziert und bei einer Parasitämie zwischen 1 und 5 % wurde diesen Tieren eine geringe Menge Blut mittels Schwanzpunktion entnommen. Dieses Blut wurde dann in RPMI Medium ohne pH-Indikator verdünnt und die erythrozytären Stadien mikroskopiert. Dabei kamen drei Filtereinstellungen zum Einsatz, sodass selektive Aufnahmen der roten bzw. grünen Fluoreszenz, und normale Durchlichtaufnahmen gemacht werden konnten. Im Anschluss konnten mit Hilfe des bildverarbeitenden Programms *ImageJ*

die Bilder des roten und grünen Signals fusioniert und dabei entsprechend pseudokoloriert werden. In Abb. 26 A werden von vier ausgewählten Parasiten (I-IV) die verschiedenen mikroskopischen Aufnahmen gezeigt, d.h. ein Bild des mCherry-Signals, des GFP-Signals, der Pseudokolorierung sowie ein Bild der Durchlichtaufnahme.

Darüber hinaus wurde von einigen Parasiten eine Serie von Bildern aufgenommen, wobei sich die Fokusebene von Bild zu Bild um $0,4 \mu\text{m}$ verschob. Auf diese Weise sollte ein dreidimensionaler Eindruck des mCherry-Signals erhalten werden. Dabei wurde die Startebene der Serie jeweils so gewählt, dass möglichst die Oberfläche des Parasiten fokussiert war. Die Fokusebene der darauf folgenden Bilder näherte sich dann sukzessiv den gegenüberliegenden Ende des Parasiten. In Abb. 26 B sind die Einzelbilder einer solchen Serie gezeigt. Diese stammt vom Parasiten I aus Abb. 26 A; oben ist die Serie des mCherry-Signals gezeigt; unten die des GFP-Signals.

Während einer ersten mikroskopischen Untersuchung der parentalen *cp α (-):mChPfCP α* Population 2 konnte in einigen Parasiten ein starkes mCherry-Signal detektiert werden. Dabei handelte es sich meist um Parasiten, die bereits große Teile des Erythrozyten ausfüllten. Nur in einem Fall konnte ein mCherry-Signal bei einem kleinen d.h. frühen erythrozytären Stadium beobachtet werden (nicht gezeigte Daten). Darüber hinaus zeigte sich, dass das mCherry-Signal nur minimal mit dem cytosolischen GFP-Signal kolokalisiert. Vielmehr scheint das mCherry-Signal eine distinkte Struktur zu markieren, die in der Peripherie des Parasiten zu finden ist. An einigen wenigen Parasiten konnte beobachtet werden, dass Teile des mCherry-Signals keinerlei Kolokalisation mit dem GFP-Signal aufwiesen (weißer Pfeil in Abb. 26 A, Parasit I). Der Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen mit den Durchlichtbildern zeigt, dass diese Signale möglicherweise aus dem Cytosol des infizierten Erythrozyten stammen.

Auch in der Serie von Bildern mit wechselnder Fokusebene bestätigt, dass das mCherry-Signal größtenteils eine andere Verteilung hat als das GFP-Signal. Während GFP das Cytosol des Parasiten als sphärischen Körper beschreibt, zeigt das mCherry-Signal eine Verteilung, die an tubuläre Strukturen erinnert. Da die Bilderserie nicht mit einem konfokalen Mikroskop erstellt wurde, ist eine präzise Aussage über die Ausdehnung dieses Signals nicht möglich. Über die mCherry-Signale, die fokussiert erscheinen, lässt sich näherungsweise eine Ausdehnung in die Tiefe von etwa $2 \mu\text{m}$ ausmachen. Neben diesen konnten aber auch Signale im Cytosol detektiert werden; sie besitzen eine deutlich geringere Intensität.

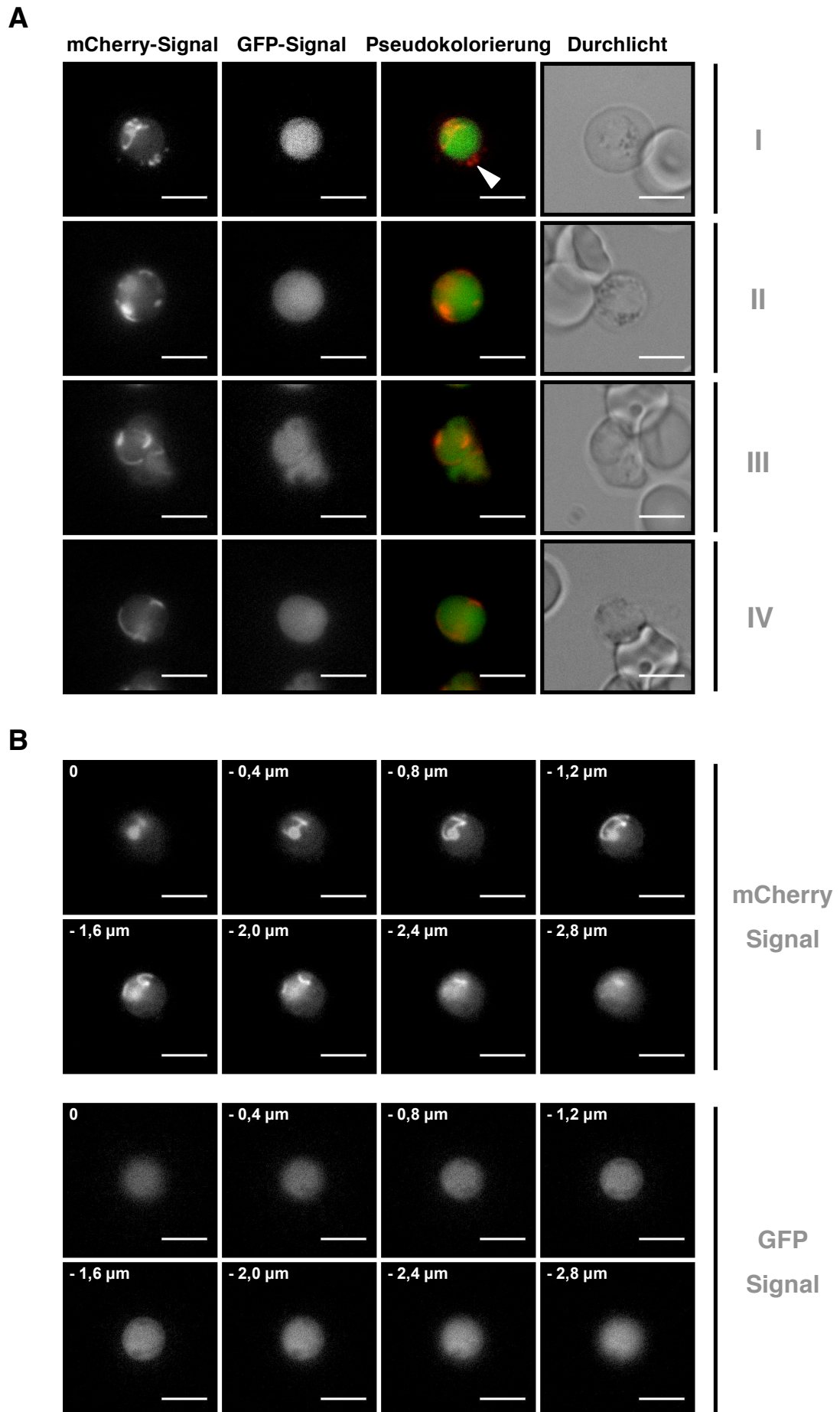


Abb. 26 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der $cp\alpha(-)::mChPfCP\alpha$ Parasiten. In **A** sind verschiedene Bilder von vier erythrozytären Parasitenstadien (I-IV) gezeigt. Von rechts nach links sind jeweils die Bilder des mCherry-Signals, des GFP-Signals, der Pseudokolorierung und des Durchlichts gezeigt. Der weiße Pfeil zeigt auf eine Region, wo das mCherry-Signal keinerlei Kolorisation mit dem GFP-Signal zeigt. In **B** sind zwei Bilderserien mit sukzessiv wechselnder Fokusebene gezeigt. Von Bild zu Bild verschiebt sich die Fokusebene um $0,4 \mu\text{m}$; beginnend an der Oberfläche des Parasiten hin zum gegenüberliegenden Ende. Gezeigt sind das mCherry-Signal (oben) und das GFP-Signal (unten) des Parasiten I aus Teil A der Abbildung. Die Maßstäbe unten rechts entsprechen einer Länge von $5 \mu\text{m}$.

Die Aussagekraft dieser Ergebnisse ist jedoch eingeschränkt. Zwar ist in einigen Parasiten ein starkes mCherry-Signal detektierbar und die Genotypisierung spricht für einen erfolgreichen Austausch des endogenen Lokus, dennoch kann eine atypische Rekombination in einer parentalen Population nicht vollständig ausgeschlossen werden. Der Genotypisierung zu Folge müsste ein solcher Parasit eine Verdopplung des $PbCP\alpha$ Lokus erfahren haben, von denen einer durch den Vektor $pmChPfCP\alpha$ ausgetauscht worden wäre. Vor diesem Hintergrund könnte man sich beispielsweise vorstellen, dass mCherry nicht als Fusionsprotein exprimiert würde und somit nicht die Lokalisierung von $PfCP\alpha$ anzeigt. Das überaus interessante Fluoreszenzmuster ist daher skeptisch zu beurteilen. In Anbetracht dessen sollte vor der Reproduktion dieser einleitenden mikroskopischen Untersuchungen, eine klonale $cp\alpha(-)::mChPfCP\alpha$ Linie separiert werden. In dieser sollten das fluoreszierende mCherry und *P. falciparum* $CP\alpha$ tatsächlich als Fusionsprotein, von einem gemeinsamen offenen Leseraster aus, exprimiert werden. Die Isolation einer $cp\alpha(-)::mChPfCP\alpha$ Linie erfolgte in Analogie zur Klonierung von $cp\beta(-)$ Parasiten (s. 3.2.1). Als Ausgangspopulation diente wiederum die parentale Population 2. Aus der Injektion von je einem Parasiten in neun NMRI-Mäuse, resultierten drei Blutstadienpopulationen (I_1 , I_5 , II_2). Deren genomische DNA wurde isoliert und wie die der parentalen Populationen mittels PCR genotypisiert (Abb. 27).

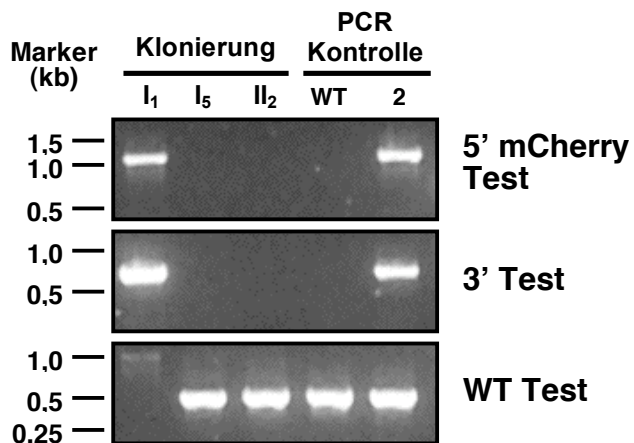


Abb. 27 Phaerogramm der Genotypisierung der $cp\alpha(-)::mChPfCP\alpha$ Klonierung. Durch die PCR Reaktionen mit den *replacement*-spezifischen Oligonukleotidkombination 5' mCherry Test und 3' Test kann nur ein Signal vom rekombinanten Lokus amplifiziert werden. Die Verwendung einer WT-spezifischen Kombination (WT Test) zeigt, dass I_1 eine klonale Population ist, in welcher der WT Lokus durch den Vektor $pmChPfCP\alpha$ ersetzt wurde. Als PCR Kontrolle diente WT genomische DNA (WT) und die parentale Population 2. Der Marker zeigt die Größe der Fragmente in Kilobasen (kb).

Wie die Genotypisierung zeigte, ging aus der Klonierung eine klonale $cp\alpha(-)::mChPfCP\alpha$ Linie hervor. Die Population I_1 zeigt *replacement*-spezifische Banden im Phaerogramm der 5' mCherry- und der 3'-Test PCR; ein WT-spezifisches Signal konnte nicht detektiert werden, lediglich eine sehr schwache Bande, die nicht der erwarteten Größe von ca. 0,5 kb entspricht. Bei den Populationen I_5 und II_2 handelt es sich um klonale WT Linien. Somit konnte auch in einer zweiten unabhängigen Transfektion gezeigt werden, dass der $PbCP\alpha$ Lokus nicht refraktär gegenüber homologer Rekombination ist.

Die klonale *cpα(-)::mChPfcPα* Population I₁ wurde im Anschluss wie die parentale Population 2 mikroskopisch untersucht. Bei der Analyse von mehreren erythrozytären Populationen, die teilweise von verschiedenen Blutstabilaten induziert wurden, konnten keine Signale ausgemacht werden, die in Intensität und Muster den oben gezeigten entsprachen. Eine repräsentative, mikroskopische Aufnahme eines klonalen *cpα(-)::mChPfcPα* Parasiten ist in Abb. 28 gezeigt.

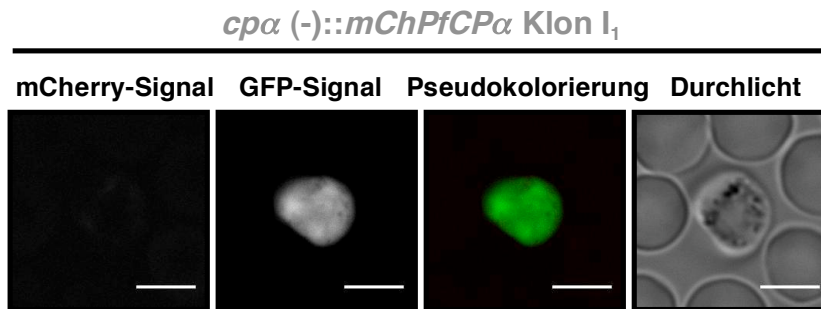


Abb. 28 Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des *cpα(-)::mChPfcPα* Klon I₁. Von rechts nach links sind jeweils die Bilder des mCherry-Signals, des GFP-Signals, der Pseudokolorierung und des Durchlichts gezeigt. Die Maßstäbe unten rechts entsprechen einer Länge von 5 μ m.

Dieses Ergebnis ist nicht ungewöhnlich und kann verschiedene Gründe haben. Möglicherweise hat der isolierte Klon eine Mutation, welche die Intensität der Fluoreszenz beeinflusst. Zur Isolation eines anderen Klons wäre eine erneute Transfektion bzw. eine zweite Klonierung notwendig, die aus zeitlichen Gründen nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden konnte.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass CP α eine vitale Rolle für die erythrozytären Stadien von *P. berghei* spielt. Erstaunlicherweise kann *P. berghei* CP α nach der Depletion der β Untereinheit diese Funktion alleine übernehmen. Im genetischen Austausch war *P. falciparum* CP α in der Lage für *P. berghei* CP α zu komplementieren; diese Eigenschaft ist eng mit der actinbindenden Funktion des C-Terminus verbunden. Erste Versuche zur Lokalisierung von CP α im Parasiten zeigten ein interessantes Fluoreszenzmuster an der Peripherie des Parasiten und möglicherweise im Cytosol des Erythrozyten; eine Beobachtung, die womöglich auf eine Funktion von CP α in der infizierten Wirtszelle hinweist.

3.4 Die rekombinanten *P. berghei* CP Untereinheiten besitzen unabhängige *capping*-Aktivitäten

Die Analyse des *P. berghei capping protein* enthüllte einige überraschende Eigenschaften, die bislang für kein anderes *capping protein* beschreiben wurden. Besonders die Entdeckung, dass beide Untereinheiten an verschiedenen Stellen im *Plasmodium*-Lebenszyklus eine essentielle Funktion übernehmen, ist von Bedeutung. Alle bisherigen Publikationen zeigten, dass das *capping protein* nur als α/β Heterodimer stabil und funktionell ist (Cooper and Sept, 2008).

3.4.1 Die rekombinante Expression von *Plasmodium CP*

Mit Hilfe von biochemischen Methoden sollten daher die bisherigen Ergebnisse zu Funktion von *P. berghei CP* überprüft werden. Zunächst sollte *PbCP* rekombinant in *E. coli* Bakterien exprimiert werden. Funktionelles CP konnte erstmals rekombinant exprimiert werden, indem beide Untereinheiten simultan von einem Vektor aus exprimiert wurden (Soeno *et al.*, 1998). In Analogie dazu wurde für die Expression von *PbCP* der Vektor pETDuet-1 verwendet, der eine Koexpression von zwei Proteinen ermöglicht. pETDuet-1 besitzt zwei sog. *multiple cloning sites* (MCS), in die ein Zielgen kloniert werden kann. Beide MCS stehen unter der Kontrolle je eines T7 Promotors (T7) und eines *lac* Operators. Mit dem Lactose-Analog Isopropyl-1thio- β -D-galactopyranosid (IPTG) kann die Koexpression induziert werden. Darüber hinaus kann an beide Proteine ein Peptid fusioniert werden, welches die spätere Aufreinigung ermöglicht. Die MCS I fusioniert N-terminal ein Hexahistidinpeptid (6His); die MCS II fusioniert C-terminal ein sog. *S-tag* (nicht gezeigt) (Abb. 29 A). In diesen Vektor wurden die kodierenden Sequenzen von *PbCP* α und β kloniert, sodass insgesamt drei verschiedene Konstrukte resultierten (Abb. 29 B).

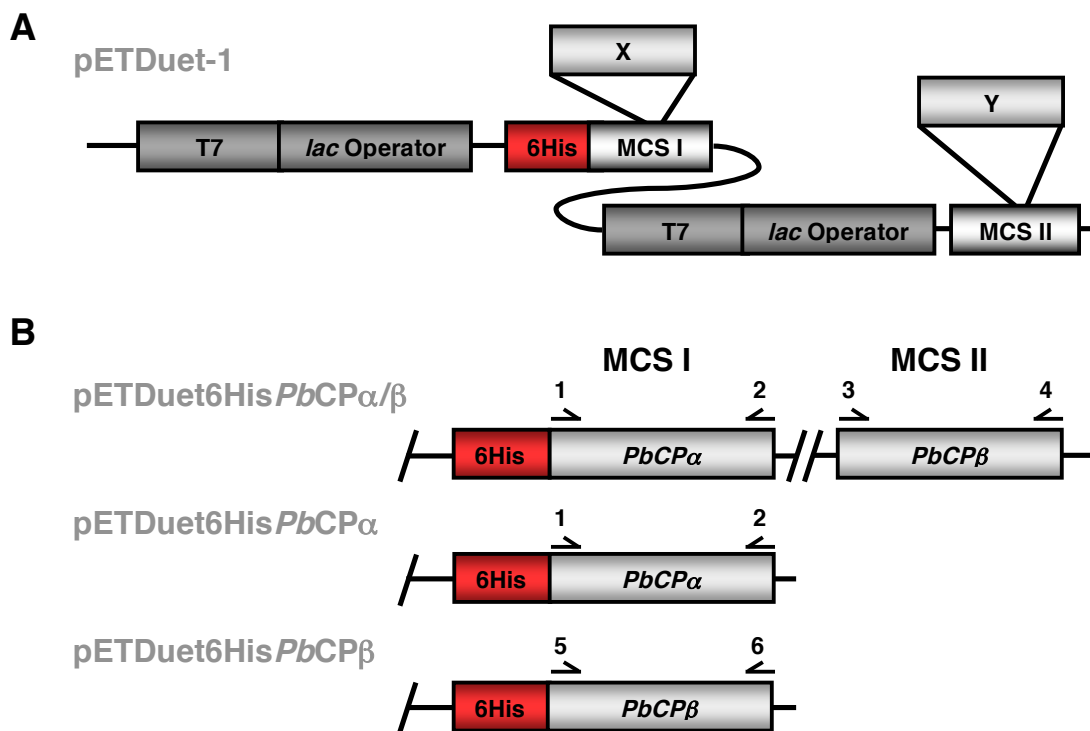


Abb. 29 Illustration der Strategie zur rekombinanten Expression von *PbCP*. **A** Der Vektor pETDuet-1 ermöglicht die Koexpression von zwei Proteinen (X und Y), die in die *multiple cloning site* (MCS) I und II kloniert werden können. Genprodukte der MCS I werden N-terminal mit einem 6His-Peptid fusioniert; das C-terminale *S-tag* der MCS II ist nicht gezeigt. Beide MCS stehen unter der Kontrolle je eines T7 Promotors (T7) und eines *lac* Operators. Mit dem Lactose-Analog Isopropyl-1thio- β -D-galactopyranosid (IPTG) kann die Koexpression induziert werden. **B** Schematische Darstellung der drei Konstrukte zur rekombinanten Expression von *PbCP*: pETDuet6HisPbCP α/β enthält beide Untereinheiten, wobei die α Untereinheit als Fusionsprotein mit einem 6His-Peptid exprimiert wird. pETDuet6HisPbCP α enthält nur die α Untereinheit als Fusionsprotein; pETDuet6HisPbCP β enthält nur die β Untereinheit als Fusionsprotein. Die 6His-Peptide wurden jeweils N-terminal fusioniert um die actinbindende Funktion des C-Terminus nicht zu gefährden. 1-6 kennzeichnet die Oligonukleotide, mit denen die verschiedenen Sequenzen amplifiziert wurden (1: DOUBLEexp1+HIS PbCP α for_BamHI; 2: DOUBLEexp1PbCP α rev_NotI; 3: DOUBLEexp2PbCP β for_MfeI; 4: DOUBLEexp2-S.tag PbCP β rev_KpnI; 5: DOUBLEexp1+hisPbCP β for_BamHI; 6: DOUBLEexp1+hisPbCP β rev_NotI).

Die Klonierung dieser Konstrukte wurde durch verschiedene Restriktionsverdau kontrolliert. Darüber hinaus wurden alle Konstrukte sequenziert um eine korrekte Expression zu gewährleisten (nicht gezeigte Daten).

Die Expression, Aufreinigung und Identifizierung der rekombinanten Proteine wurde von Herwig Schüler durchgeführt. Die folgenden Angaben und Daten wurden freundlicherweise zu Verfügung gestellt.

Die verschiedenen Konstrukte wurden zunächst in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)RIPL transformiert und die Expression der Proteine mit 0,5 mM IPTG induziert. Sie erfolgte jeweils in 2 x 0,75 l LB-Medium bei 37 °C über 3 bis 4 Stunden. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert und der Niederschlag lysiert. Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden die jeweiligen Lysate auf sog. *HisTrap HP columns* gegeben. Diese Säulen enthalten eine Matrix mit immobilisiertem Nickel, an das die fusionierten, N-terminalen Hexahistidinpeptide binden und so aufgereinigt werden können. In Abb. 30 sind Phaerogramme der Fraktionen gezeigt, welche die höchsten Konzentrationen an rekombinanten Proteinen hatten.

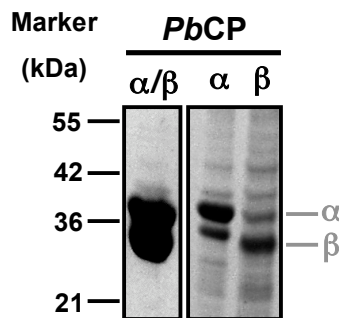


Abb. 30 Phaerogramm zur Überprüfung der rekombinanten Proteinexpression und Aufreinigung. Gezeigt sind die Aufreinigung nach der Koexpression von *PbCP* α/β ausgehend vom Vektor pETDuet6His*PbCP* α/β (rechts) sowie die Aufreinigungen nach der Expression der α bzw. β Untereinheit alleine; ausgehend von den Vektoren pETDuet6His*PbCP* α bzw. pETDuet6His*PbCP* β (links). Der Marker gibt die Größe der Proteine in Kilodalton (kDa) an. In Grau markiert sind die angenommenen Positionen der α bzw. β Untereinheit. Zur Verfügung gestellt von Herwig Schüler.

Mit 35,6 kDa für die α und 35,9 kDa für die β Untereinheit, entsprechen die theoretischen Größen der rekombinanten Proteine in etwa den prominenten Banden der gezeigten Phaerogramme; Laufunterschiede von wenigen kDa sind nicht ungewöhnlich. Ausgehend von diesen Phaerogrammen wurde ein 70-90 %ige Reinheit der Proteine angenommen.

Somit konnten erstmals beide CP Untereinheiten einzeln löslich exprimiert und aufgereinigt werden. Aus zeitlichen Gründen musste jedoch auf eine weitere, reinere Expression bzw. eine zusätzliche Aufreinigung verzichtet werden. In einem analog durchgeführten Experiment konnten auch die beiden *P. falciparum* CP Untereinheiten simultan bzw. *PfCP* α alleine exprimiert werden (unveröffentlichte Daten, Schüler *et al.*). Deren Identität wurde mit Massenspektroskopie bestätigt, was die Robustheit der *P. berghei* Ergebnisse stützt. Im Zuge der *P. falciparum* CP Analyse wurde auch die Identität der beiden prominenten Banden der *PbCP* α Aufreinigung mittels Massenspektroskopie festgestellt. Dabei zeigte sich, dass beide Banden zu *PbCP* α korrespondieren. Wahrscheinlich handelt es sich um das vollständige Protein sowie ein Degradationsprodukt, dem Teile des C-Terminus fehlen (unveröffentlichte Daten, Schüler *et al.*). Dieses Ergebnis hat Einfluss auf die Interpretation der Daten der *PbCP* α/β Koexpression, denn das verkürzte *PbCP* α Protein hatte ein ähnliches Laufverhalten wie die rekombinante β Untereinheit. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die untere Bande der *PbCP* α/β Koexpression von *PbCP* β und / oder vom *PbCP* α Degradationsprodukt gebildet wird.

3.4.2 Analyse der *capping*-Aktivität von *PbCP*

Im nächsten Schritt sollte die *capping*-Aktivität der rekombinanten *P. berghei capping*-Proteine überprüft werden. Da CP das Wachstum von Mikrofilamenten am + Ende terminiert, verschiebt die Zugabe von CP die Längenverteilung der Filamente hin zu kürzeren Filamenten (Xu *et al.*, 1999). In Analogie zur Studie von Xu *et al.* sollte daher *in vitro* getestet werden ob die verschiedenen rekombinanten Proteine alleine oder in Kombination die Längenverteilung von F-Actin beeinflussen.

Da es äußerst schwer ist *Plasmodium* Actin zu erhalten und dieses nur extrem kurze Filamente aus ca. 50 Protomeren bildet (Schmitz *et al.*, 2005; Schuler *et al.*, 2005), wurde für diesen Test heterologes, bovines Actin genutzt, welches aus nicht-muskulärem Gewebe stammt. Dieses hat den Vorteil *in vitro* Filamente zu formen, die mikroskopisch gut analysiert werden können.

Für die Visualisierung von F-Actin wurde Rhodamin-Phalloidin verwendet, einem fluoreszierenden Derivat von Phalloidin. Dieses bityclische Peptid ist im Gift des Grünen Knollenplätter Pilzes (*Amanita phalloides*) enthalten und stabilisiert F-Actin, worauf auch dessen toxische Wirkung beruht. Da Phalloidin ausschließlich an Actinfilamente bindet, können diese mit fluoreszierenden Phalloidinderivaten sichtbar gemacht und quantifiziert werden (Vandekerckhove *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 1999). Dabei wird weder die Funktionalität der Filamente noch die Interaktion anderer actinbindender Proteine (z.B. Myosin) beeinträchtigt. Beispielsweise können mit Phalloidinderivaten gefärbte Muskelfasern weiterhin kontrahieren (Cooper, 1987).

Für die Analyse der *capping*-Aktivität von *Plasmodium* CP wurde zunächst die Polymerisation von 5 μM Actin Proben induziert. Nach zwei- bis dreistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 100 nM Rhodamin-Phalloidin und mit rekombinantem *capping protein* versetzt. Dabei wurden vier verschiedene Kombinationen mehrfach getestet:

1. 0,5 μM Actin ohne CP;
2. 0,5 μM Actin + 0,1 μM *PbCP* α/β ;
3. 0,5 μM Actin + 0,1 μM *PbCP* α und
4. 0,5 μM Actin + 0,1 μM *PbCP* β .

Die jeweiligen Mischungen wurden dann auf ein Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas pipettiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation konnten die verschiedenen Proben mikroskopiert und Bilder der Actinfilamente aufgenommen werden. Im zweiten Schritt der Analyse wurde die Längenverteilung der Mikrofilamente bestimmt. Dabei kam erneut das bildverarbeitende Programm *ImageJ* zum Einsatz, mit dem es möglich ist die Länge einzelner Filamente zu vermessen. Pro Kombination wurden zwischen 1.200 und 1.400 Filamente ausgemessen, entsprechend ihrer Länge sortiert und in Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen entsprechen einer Staffelung der Filamente in 0,5 μm Schritten, wobei die erste Gruppe alle Filamente zwischen 0,5 und 1 μm einschließt; die Zweite alle Filamente zwischen 1 und 1,5 μm usw. Filamente deren Länge unter 0,5 μm oder über 25 μm lag, flossen nicht in die Analyse ein. Die Längenverteilung wurde abschließend als Zahl der Filamente pro Gruppe graphisch dargestellt und ist in Abb. 31 gezeigt; daneben sind repräsentative Bilder von Mikrofilamenten der jeweiligen Kombinationen gezeigt.

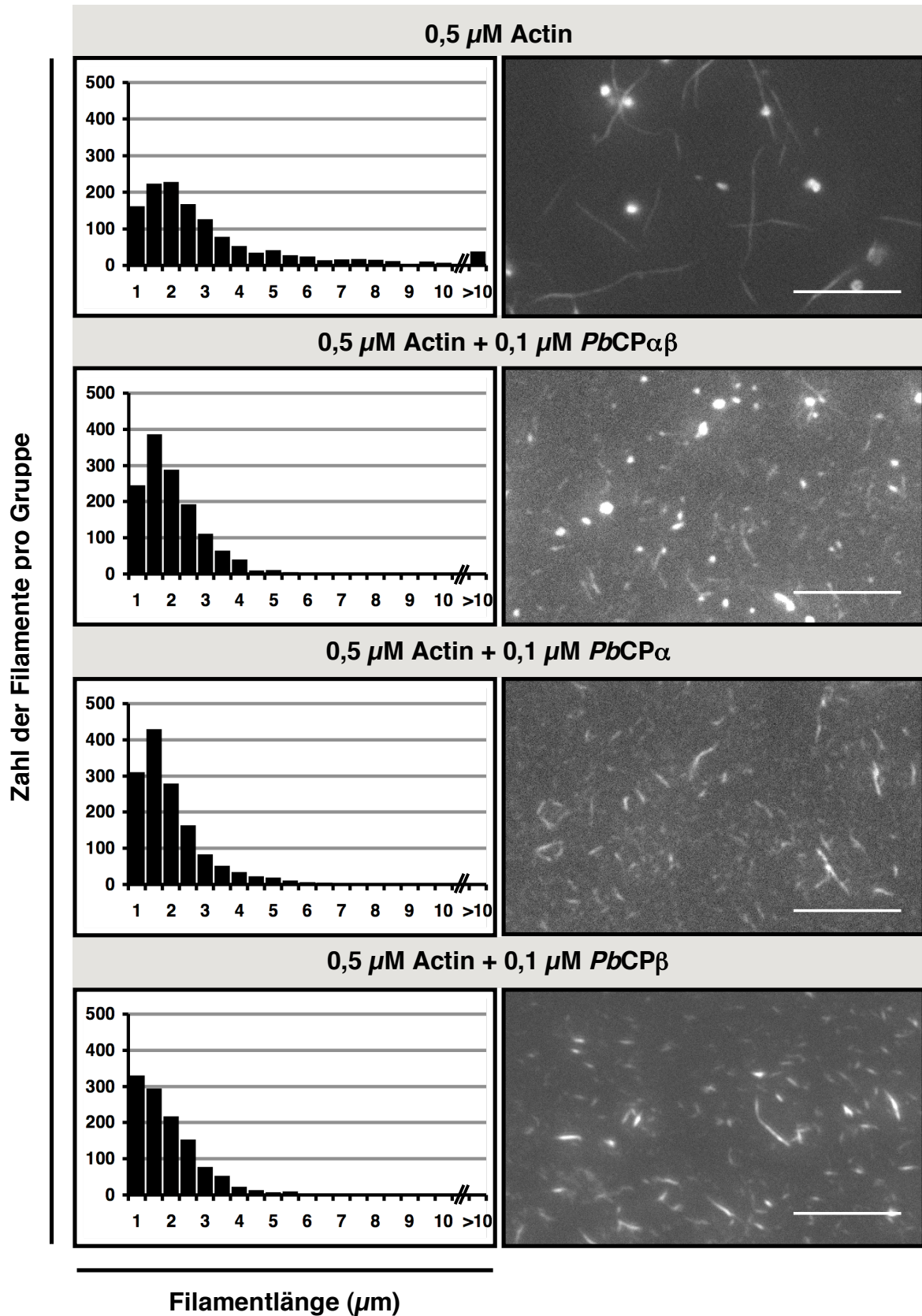


Abb. 31 Der Beeinflussung der Längenverteilung von Actinfilamenten durch *Plasmodium* CP. Links sind die Längenverteilungen von Actinfilamenten der verschiedenen Proteinkombinationen graphisch dargestellt. Rechts sind repräsentative Bilder von Mikrofilamenten gezeigt. Die Maßstäbe unten rechts entsprechen einer Länge von 10 μm .

Mit dieser biochemischen Analyse konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von *Plasmodium* CP eine Verschiebung der Filamentlängen hin zu kürzeren Polymeren verursacht. Die Anwesenheit von rekombinantem Protein führte zu einem Verschwinden von sehr langen Filamenten. Beispielsweise konnten Filamente mit einer Länge von über 10 μm nur in den Proben ohne CP gefunden werden. Darüber hinaus konnte nach der Addition von CP eine deutliche Zunahme der Filamente bis 2 μm Länge beobachtet werden. Die durchschnittlichen Längen der Filamente sind in Tab. 7 gezeigt.

Tab. 7 Durchschnittliche Länge von Actinfilamenten in An- und Abwesenheit von *Plasmodium* CP.

Proteinkombination	Filamentlänge
0,5 μM Actin	3,08 \pm 2,97 μm
0,5 μM Actin + 0,1 μM <i>PbCP</i> α/β	1,77 \pm 0,92 μm
0,5 μM Actin + 0,1 μM <i>PbCP</i> α	1,76 \pm 1,04 μm
0,5 μM Actin + 0,1 μM <i>PbCP</i> β	1,69 \pm 1,01 μm

Im Vergleich zur publizierten mittleren Länge von etwa 7 μm (Xu *et al.*, 1999), sind die unbehandelten Actinfilamente mit durchschnittlich 3 μm Länge zwar recht kurz. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sowohl die Anwesenheit von *PbCP* α/β als auch die der Untereinheiten *PbCP* α bzw. *PbCP* β die durchschnittliche Länge der Filamente annähernd halbiert.

Zusammengefasst bestätigt diese biochemische Analyse die Ergebnisse der *in silico* Modellierung und die Ergebnisse der genetischen Experimente. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den untersuchten Genen tatsächlich um die beiden Untereinheiten des *capping*-Proteins handelt. Erstmals konnten diese Untereinheiten einzeln aufgereinigt und deren *capping*-Aktivität demonstriert werden; eine Grundvoraussetzung dafür, dass die α Untereinheit alleine eine vitale Funktion in *Plasmodium* Blutstadien erfüllen kann.

4. Diskussion

Als Erreger der Malaria stehen Plasmodien seit langem im Fokus der Forschung. Auf der Suche nach neuen Interventionsstrategien wurde auch die einzigartige Bewegung von Plasmodien schon früh untersucht (Miller *et al.*, 1979; Vanderberg, 1974). Diese Fortbewegungsart ist wahrscheinlich für die schnellste Geleitbewegung einer einzelnen, eukaryotischen Zelle verantwortlich (Vanderberg, 1974). Betrachten man sich *Plasmodium* Parasiten als Modell für actinbasierte Motilität, so stellt man eines schnell fest: die bislang für *Plasmodium* beschriebenen Prozesse stellen keine Variation der üblichen Vorgänge dar. Zwar beruht die *gliding motility* der Plasmodien auch auf Actin bzw. Actinpolymeren, sie ist jedoch mit amöboider Migration anderer eukaryotischer Zellen nicht vergleichbar (Matuschewski and Schuler, 2008). Vielmehr lässt sich hier eine alternative Möglichkeit beobachten, wie mit Hilfe von Actin Motilität generiert werden kann. Die Sequenzierung des *Plasmodium* Genoms unterstrich die Eigentümlichkeit dieser Bewegungsform (Gardner *et al.*, 2002). Anders als bei den meisten anderen Eukaryoten ist das Repertoire an actinbindenden Proteinen in *Plasmodium* erstaunlich klein: nur etwas mehr als ein Dutzend Proteine gehört dazu (Schuler and Matuschewski, 2006b). Dies trägt maßgeblich zur Attraktivität des *Plasmodium*-Modells bei, denn die Regulation von Actin erreicht nur einen mittleren Grad an Komplexität. Die Möglichkeit der genetischen Manipulation und die gut zu untersuchende Lokomotion liefern zusätzliche Werkzeuge um *in vivo* die eigentümliche Actinregulation in *Plasmodium* zu studieren. Ein besseres Verständnis der Mechanismen der Motilität von *Plasmodium* kann daher in zweierlei Hinsicht von Vorteil sein: einerseits können hier grundlegende Erkenntnisse zu Regulation von Actin gesammelt werden. Andererseits können dringend benötigte neue Interventionsstrategien aufgezeigt werden, die letztlich zur Bekämpfung von Malaria beitragen könnten. Tatsächlich zeigten bisherige Arbeiten zu Actin und dessen Regulation in *Plasmodium* und anderen Apicomplexa sehr deutlich, dass die Eigenschaften von Actin und regulatorischer Proteine oftmals nur in Grundzügen mit denen homologer Proteine vergleichbar sind. Das wohl eindrucksvollste Beispiel hierfür ist *Plasmodium* Actin selbst. Nur mit großer Mühe kann man extrem kurze Polymere *in vitro* nachweisen; ein *in vivo* Nachweis scheiterte bislang (Schmitz *et al.*, 2005; Schuler *et al.*, 2005b; Schuler and Matuschewski, 2006a).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das heterodimere *capping protein* und dessen Eigenschaft Actinfilamente durch die Interaktion mit dem + Ende zu stabilisieren (s. 1.3.2). Es gehört zu den wenigen regulatorischen Proteinen, die im *Plasmodium* Genom vorgefunden wurden (Gardner *et al.*, 2002; Schuler and Matuschewski, 2006b). Die Charakterisierung von beiden *Plasmodium berghei* CP Untereinheiten mit unterschiedlichen Methoden demonstrierte außergewöhnliche Eigenschaften, die für kein anders Homolog beschrieben sind. Erstmals konnte an *P. berghei* gezeigt werden, dass beide Untereinheiten verschiedene, essentielle Funktionen erfüllen können. Während *PbCP α* essentiell für die Proliferation in erythrozytären Stadien ist, erfüllt *PbCP β* eine vitale Rolle für anopheline Stadien. Diese höchst ungewöhnliche Entdeckung spiegelt sich in nahezu allen Ergebnissen wider. Wie diese Entdeckung erklärt werden kann, welche Fragen sie aufwirft und welchen Einfluss sie auf das Modell der *gliding motility* im *Plasmodium* hat, soll im Folgenden diskutiert werden.

Eine altbekannter Fremder: das P. berghei capping protein

Der Vergleich der Sequenzinformationen lieferte stichhaltige Indizien, dass es sich bei den untersuchten Genen tatsächlich um die von *capping* Proteinen handelt (Abb. 9). Alle Aminosäuren, die maßgeblich zur Interaktion mit Actin beitragen, sind in *Plasmodium* konserviert (Yamashita *et al.*, 2003)(Abb. 9). Außerdem sind die Aminosäuren konserviert, die an der Bildung des CP Heterodimers beteiligt sind. Sie befinden sich besonders an den zentralen β -Faltblättern, der α -Helices am N-Terminus sowie der α -Helices im oberen Teil des Dimers und verleihen diesen Bereichen einen hydrophoben Charakter (Abb. 4, 9 und 10). Durch eine Dimerisierung können die hydrophoben Bereiche vor der wässrigen Umgebung geschützt werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass ein Dimer die physiologisch relevante Form von *Plasmodium* CP ist.

Die *in silico* Modellierung verschaffte weitere Informationen über das *Plasmodium berghei* *capping protein*. Obwohl die *PbCP* Untereinheiten nur zu etwa 25 % identisch sind, ließ sich eine hypothetische Struktur auf Basis der *G. gallus* CP Kristallstruktur modellieren (Yamashita *et al.*, 2003). Wie diese, besitzt auch die hypothetische *P. berghei* CP Struktur zwei Symmetrieachsen im α/β Heterodimer (Abb. 10). Diese doppelte Symmetrie bedingt auch, dass beide *P. berghei* Untereinheiten theoretisch in der Lage sind Homodimere zu formen. Angesichts der verschiedenen essentiellen Funktionen von α und β Untereinheit ist daher theoretisch denkbar, dass ein Homodimer die physiologisch relevante Spezies darstellt. Bei dieser Modellierung wurde auch der chemische Charakter des β C-Terminus von *P. berghei* CP überprüft. Im aktuellen Modell der CP-Bindung an Actin kommt dem β C-Terminus eine wichtige Funktion zu, die mit dessen amphipathischen Charakter verknüpft ist (Narita *et al.*, 2006). Wie die Modellierung zeigte, besitzt auch der *P. berghei* β C-Terminus diese Eigenschaft (Abb. 11). Sequenzvergleich und Modellierungen zeichnen ein ungewöhnliches Bild der beiden *PbCP* Untereinheiten. Sie zeigen viele Ähnlichkeiten, die sie als echte *capping*-Proteine ausweisen aber auch viele Eigenheiten, die wahrscheinlich eine Anpassung an die speziellen Verhältnisse in *Plasmodium* darstellen.

Eine Eigenschaft der beiden *Plasmodium* CP Untereinheiten war allerdings überraschend: die Größe. Sie liegt jeweils am oberen Ende des Spektrums (Abb. 9). Die α Untereinheiten von *P. berghei* und *P. falciparum* besitzen eine auffallende Insertion von 23 Aminosäuren zwischen zwei konservierten Aminosäuren, die an der Dimerisierung beteiligt sind (*P. berghei* Tyr126 und Try162). Möglicherweise ist dies eine Anpassung an einen α/α Homodimer. Auch die beiden β Untereinheiten sind durch eine 17 Aminosäuren Insertion am C-Terminus gekennzeichnet. Darüber hinaus ist *PbCP β* durch 9 weitere C-terminale Aminosäuren verlängert. Diese Extension stellt wahrscheinlich eine evolutionäre Anpassung an die speziellen intrinsischen Eigenschaften von *Plasmodium* Actin dar. Um derart instabiles F-Actin effizient zu stabilisieren, könnte ein längerer C-Terminus von Vorteil sein. Möglicherweise ist *Plasmodium* β CP in der Lage mit mehr als nur einem Actinprotomer zu interagieren, wie es das aktuelle Modell vorsieht (Narita *et al.*, 2006). Im Falle einer β/β Homodimerisierung könnte diese Insertion auch ein Mimikry des α C-Terminus darstellen, der für die initiale Bindung an Actin verantwortlich ist. Jedoch fehlt der Insertion ein Tryptophan, welches im Heterodimer für die Fixierung des α C-Terminus auf der β Untereinheit verantwortlich ist.

Auch die Transkriptionsanalyse zeigte ein interessantes Bild. Mittels Reverse Transkriptase PCR konnten zwar Transkripte beider Untereinheiten in allen invasiven Stadien detektiert werden (Abb. 12). Auffallend war jedoch, dass das CP α Transkript in Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten nicht gänzlich in gespleißter Form vorlag. Möglicherweise ist dies ein Grund dafür, warum nur CP β als *up-regulated in infective sporozoites* beschrieben wurde (Matuschewski *et al.*, 2002). Offen bleibt, ob CP α und β in den entsprechenden Stadien tatsächlich exprimiert werden. Dankbar wäre auch, dass CP α nur in erythrozytären Stadien exprimiert wird, während CP β nur im Moskito-Vektor vorhanden ist. Gegen diese Vermutung spricht jedoch eine Publikation von Tardieux *et al.*, welche die biochemische Funktion eines F-Actin bindenden Komplexes aus *P. knowlesi* Merozoiten beschreibt (s. 1.3.5)(Tardieux *et al.*, 1998a). Diese Eigenschaften legen die Vermutung nahe, dass es sich bei zwei der drei Proteine des Komplexes um die beiden Untereinheiten von CP handelt. Zwar konnte formal nur die Identität des dritten Proteins, nämlich Hsp70, bestätigt werden, dennoch sprechen diese Daten für einen Heterodimer als physiologisch relevante Form in erythrozytären Stadien.

Die Rolle von CP β für Plasmodium berghei

Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit ist die erfolgreiche Depletion der *P. berghei* CP β in erythrozytären Stadien. Mittels PCR Analysen konnte die Integration des *replacement*-Konstrukts im gewünschten Locus sowie die vollständige Depletion von CP β Transkripten gezeigt werden (Abb. 14-15). Erstaunlicherweise blieb jedoch die Proliferationsrate während der erythrozytären Schizogonie in *cp β (-)* Parasiten unbeeinflusst (Abb. 16). An vielen Stellen der erythrozytären Schizogonie sind Probleme denkbar, die sich negativ auf die Proliferation auswirken. Zwei davon konnten zuvor mit Actin in Verbindung gebracht werden: die Nahrungsaufnahme des Parasiten und die Invasion der Erythrozyten. Für die enorme Proliferation muss der Parasit eine große Menge Nahrung durch Endocytose aufnehmen. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Actin am endocytotischen Vesikeltransport in *P. falciparum* beteiligt ist (Smythe *et al.*, 2008). Hätte die Einbuße von CP β einen starken, negativen Effekt auf den Nahrungstransport, so wäre dieser Defekt mit großer Wahrscheinlichkeit detektierbar. Möglicherweise übernimmt die α Untereinheit die Funktion des CP Heterodimers alleine. Alternativ könnte Endocytose in Plasmodien ohne *capping*-Aktivität auskommen. Angesichts der intrinsischen Instabilität von *Plasmodium* F-Actin, ist diese Schlussfolgerung jedoch recht unwahrscheinlich, was auf eine Beteiligung von CP α hindeutet. Weitere Proteine mit *capping*-Aktivität in *Plasmodium* sind die beiden Formine. Für Formin2 ist eine cytosolische Lokalisation beschrieben (Baum *et al.*, 2008). Unter Umständen kompensiert auch Formin2 für den Verlust der β Untereinheit. Noch anfälliger für einen Defekt erscheint indes die Invasion der Erythrozyten durch *cp β (-)* Parasiten. Dass Actin eine wichtige Funktion während der Invasion von Erythrozyten hat, ist seit langem bekannt (Miller *et al.*, 1979). Darüber hinaus konnte Formin1 in *P. falciparum* an der ringförmigen Verbindungsstelle zwischen invadierendem Merozoit und Erythrozyt ausgemacht werden. An der *moving junction* katalysiert Formin1 mit hoher Wahrscheinlichkeit die Nukleation von F-Actin, welches dann in die Motormaschinerie integriert werden kann (Abb. 3)(Baum *et al.*, 2008). Hätte die

Depletion von *PbCP* β einen profunden, negativen Effekt auf die Invasion der Merozoiten, so sollte sich dieser auf die Proliferationsrate niederschlagen.

Dies ist nicht der Fall und wiederum kommen mehrere Erklärungsmöglichkeiten in Frage. Ist beispielsweise in *cp* β (-) Parasiten nur die Dauer der Invasion und nicht deren Effizienz beeinflusst, so könnte ein Phänotyp leicht unter die Detektionsgrenze fallen; denn mit 20-30 sec ist die Dauer der Invasion im Vergleich mit der Gesamtdauer der Schizogonie (~24 h) extrem kurz (Cowman and Crabb, 2006). Daher ist es fraglich ob selbst eine deutliche Verlängerung der Invasionsdauer nachzuweisen wäre. Eine Herabsetzung der Invasionseffizienz in *cp* β (-) Parasiten ist sehr unwahrscheinlich, da dies mit großer Wahrscheinlichkeit die Proliferationsrate beeinflusst.

Alternativ könnte auch hier das Fehlen der β Untereinheit durch ein α/α Homodimer vollständig komplementiert werden, sodass die Proliferation unbeeinflusst bleibt. Möglicherweise kann aber auch Formin1 die Rolle von *CP* β ausfüllen. Dies könnte in der Struktur der *moving junction* begründet sein, denn sie bildet ein ringförmiges Widerlager für die Motormaschinerie. Das bedeutet, die Länge der Filamente muss lediglich der Tiefe der *moving junction* entsprechen. Dies könnte auch durch die *capping*-Aktivität von Formin1 gewährleistet werden, welches eine essentielle Funktion in Blutstadien erfüllt (Baum *et al.*, 2008). Eine exakte Lokalisierung von *PbCP* α und β in Blutstadien könnte diese Fragen klären.

Eine interessante Entdeckung grenzte den *cp* β (-) Phänotyp entscheidend ein. Sowohl Gametogonie als auch Sporogonie schienen unbeeinflusst. Die Gametogonie von *cp* β (-) Parasiten, also der Entwicklung von sexuellen Stadien und Ookineten verlief normal: *cp* β (-) Parasiten bildeten ähnlich viele sexuelle Stadien und auch die Zahl der diploiden Ookineten war vergleichbar mit den WT Zahlen (Tab. 2). Da die Schwankungen während dieser Experimente naturgemäß sehr hoch sind, ist jedoch etwas Vorsicht bei der Interpretation dieser Ergebnisse angebracht. Festzustellen ist aber, dass *cp* β (-) Parasiten in der Lage sind auch sehr große Mengen an Ookineten zu formen. Auch die äußerst wenigen Oocysten waren in der Lage substantielle Mengen an Sporozoiten zu formen (Tab. 3). Wie zuvor die Gametogonie durchliefen die *cp* β (-) Parasiten auch die Sporogonie ohne evidenten Phänotyp. Vor diesem Hintergrund erscheint es wahrscheinlich, dass die eigentliche Schizogonie ebenfalls unbeeinflusst ist.

Erst bei der Untersuchung der Motilität der anophelinen Parasitenstadien manifestierte sich der *cp* β (-) Phänotyp in vollem Ausmaß. Bei der Untersuchung der Ookineten und deren Verbleib im Mosquito wurde schnell klar, dass *cp* β (-) Ookineten nur sehr eingeschränkt infektiös sind. Lediglich ein Bruchteil der üblichen Zahl an Ookineten erreicht die basale Seite des Moskitomitteldarms und entwickelt sich zu Oocysten (Abb. 17). Von der Gestaltung der Experimente konnte abgeleitet werden, dass der Grund für diesen Phänotyp eine eingeschränkte Motilität ist. Durch die Infektion mit gleichen Mengen an *in vitro* kultivierten Ookineten konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp nicht in einer geringeren Zahl an Ookineten begründet liegt. Die Annahme, dass die Gametogonie intakt ist, wurde so indirekt bestätigt. Dieses Experiment zeigte außerdem, dass die peritrophe Membran, die erst einige Stunden nach der Blutmahlzeit gebildet wird, keine besondere Barriere für *cp* β (-) Ookineten

darstellt. Obwohl die Ookineten nach der Membranfütterung die Möglichkeit hatten den Mitteldarm ohne diese zusätzliche Barriere zu durchdringen, stieg der durchschnittliche Oocystenbesatz nicht. Im Gegenteil, der Oocystenbesatz lag noch leicht unter dem der normalen Fütterung. Von diesen Ergebnissen kann ferner abgeleitet werden, dass die Sekretion von Chitinasen, die zur Penetration der peritrophen Membran benötigt werden, nicht beeinflusst wurde. Im Falle der WT Parasiten war die mittlere Zahl an Oocysten pro Mitteldarm nach normaler bzw. Membranfütterung annähernd gleich (Abb. 17), was die Robustheit dieser Experimente unterstreicht. Offen ist jedoch wo die *cpβ(-)* Ookineten in so großer Zahl eliminiert werden. Können sie die Blutmahlzeit nicht rechtzeitig verlassen und werden ebenfalls verdaut oder scheitern sie bei der Transmigration des Mitteldarmepithels? Eine elegante Antwort auf diese Frage können Infektionsexperimente mit einem melanisierenden Moskitostamm geben. Die Einkapselung und Melanisierung von Pathogenen ist für Moskitos und viele andere Arthropoden eine wichtige Immunreaktion (Blandin and Levashina, 2004; Storch and Welch, 1997). Sie kann jedoch beim verwendeten Moskitostamm nicht beobachtet werden. An einem melanisierenden Moskitostamm können jedoch die bei der Transmigration abgetöteten Parasiten direkt quantifiziert werden. Im Vergleich mit WT Ookineten kann so geklärt werden wo die Masse der *cpβ(-)* Ookineten getilgt wird.

Durch die *in vitro* Analyse der Motilität von *cpβ(-)* und WT Ookineten konnte der gerade beschriebene Phänotyp auch formal mit einer verminderten Motilität korreliert werden. Rekombinante Ookineten bewegten sich im Mittel nur etwa halb so schnell wie WT Ookineten (Abb. 18). Dieses Ergebnis zeigt, dass CP β eine wichtige, jedoch keine essentielle, Funktion für die Motilität der Ookineten innehat. Wie kann dieser Phänotyp interpretiert werden? Zunächst könnte man annehmen, dass die α Untereinheit eine gewisse *capping*-Aktivität beisteuert und den Verlust der β Untereinheit partiell komplementiert. Wie bereits für die Invasion von Merozoiten diskutiert besitzt auch Formin *capping*-Aktivität. In den langsamen Ookineten, die dazu nur eine relativ kurze Strecke zurücklegen müssen, könnte die *capping*-Aktivität von α/α Homodimeren und / oder Formin ausreichend sein um deren Transmigration zu sichern. Diese Annahmen könnten leicht durch eine Expressionsanalyse von CP α und Formin überprüft werden. In einem zweiten Schritt könnte eine stadienspezifische Depletionen von CP α bzw. Formin in *cpβ(-)* Parasiten aufschlussreich sein. Durch den Austausch von Promotersequenzen kann beispielsweise eine Depletion in anophelinen *Plasmodium* Stadien erreicht werden. So könnte getestet werden, welchen Einfluss CP α und Formin auf die Motilität von *cpβ(-)* Ookineten hat.

Am dramatischsten manifestierte sich der *cpβ(-)* Phänotyp in Sporozoiten. Diese wurden zwar in ausreichender Menge gebildet, allerdings deutete die Quantifizierung der *cpβ(-)* Sporozoiten von den verschiedenen Kompartimenten des Moskitos auf einen dramatischen Motilitätsdefekt. Ganz offensichtlich waren die Mehrzahl der Sporozoiten nicht in der Lage die Oocysten zu verlassen. Auch dreißig Tage nach der Infektion war ein große Zahl *cpβ(-)* Sporozoiten mit dem Mitteldarm assoziiert. Auch Sporozoiten, denen die *egress cystein protease 1* (ECP-1) fehlt, bleiben mit dem Mitteldarm assoziiert. Keiner dieser Parasiten erreicht das Hämocoel, denn durch die Funktion von *ECP1* wird die

Oocyste permeabel für Sporozoiten (Aly and Matuschewski, 2005). Da die *cpβ(-)* Sporozoiten nicht gänzlich in den Oocysten verblieben, scheint die Sekretion von ECP1 nicht beeinflusst zu sein; eine ähnliche Situation wie die Sekretion der Chitinasen in Ookineten.

Anders als die *cpβ(-)* Ookineten im Falle der Transmigration des Mitteldarms waren die wenigen Sporozoiten jedoch nicht in der Lage die Speicheldrüsen zu besiedeln, was eine vollständige Unterbrechung des Lebenszyklus zur Folge hatte (Tab. 3). Auch sog. *s6(-)* Parasiten sind nicht fähig die Speicheldrüsen zu besiedeln. Im Gegensatz zu *cpβ(-)* Sporozoiten akkumulieren sie jedoch im Hämocoel und bleiben nicht mit dem Mitteldarm assoziiert (Steinbuechel and Matuschewski, 2009). Offenbar sind *cpβ(-)* Sporozoiten stärker in ihrer Motilität eingeschränkt als *s6(-)* Sporozoiten.

Erneut konnte die *in vitro* Analyse der Lokomotion von Sporozoiten den gefundenen Phänotyp formal mit einem Motilitätsdefekt korrelieren. Anders als *cpβ(-)* Ookineten, deren produktive Motilität lediglich herabgesetzt ist, haben *cpβ(-)* Sporozoiten diese gänzlich verloren. Sie sind nur in der Lage unproduktiv vor und zurück zu geleiten, wobei sie fokal auf dem Substrat adhärieren (Abb. 19). Dabei legt der Sporozoit maximal eine Strecke zurück, die der eigenen Körperlänge entspricht.

Dieses Bewegungsmuster ist auch für *s6(-)* und *trap(-)* Sporozoiten beschrieben. Sie sind ebenfalls nicht fähig produktiv zu gleiten (Steinbuechel and Matuschewski, 2009; Sultan *et al.*, 1997). Bei diesen Proteinen handelt es sich um Oberflächenproteine. Mit der Depletion von CPβ konnte erstmals dieser Phänotyp durch ein cytosolisches Protein hervorgerufen werden. Eine Gemeinsamkeit dieser Proteine ist jedoch auffällig: sie alle sind Teil der Motormaschinerie des Sporozoiten. Auf dieser Gemeinsamkeit beruht auch eine Interpretation dieses einheitlichen Phänotyps. Zwar ist der molekulare Motor von Merozoit, Ookinet und Sporozoit prinzipiell konserviert, dennoch scheint es stadienspezifische Variationen zu geben. Dies zeigt sich beispielsweise bei den Invasinen, die das Substrat mit dem eigentlichen Actin/Myosin-Motor verbinden. Zwar sind sie stets Mitglieder der TRAP-Familie aber jedes motile Stadium integriert ein anderes Protein in die Motormaschinerie: in Merozoiten ist es MTRAP (Baum *et al.*, 2006), in Ookineten ist es CTRP (Vlachou *et al.*, 2006) und in Sporozoiten sind es TRAP selbst sowie S6 (Steinbuechel and Matuschewski, 2009; Sultan *et al.*, 1997).

Da der Verlust von *PbCPβ* weder durch *PbCPα* noch durch ein *PbFormin* komplementiert werden konnte, ist es legitim auch CPβ als spezialisierte Komponente der Sporozoiten-Motormaschinerie zu bezeichnen. Fehlt eine dieser Komponenten - S6, TRAP oder CPβ -, so kann auch die spezialisierte Form von Motilität nicht mehr gewährleistet werden: eine Lokomotion über große Distanzen kann nicht mehr stattfinden (Abb. 19).

Betrachtet man die unproduktive Bewegung der *cpβ(-)* Sporozoiten etwas genauer, so wird man an die Invasion von Merozoiten erinnert. Wie Merozoiten während der Invasion, können sich auch die rekombinanten Sporozoiten nur noch um eine Körperlänge fortbewegen. Es ist vorstellbar, dass diese Art der Motilität von einer Motormaschinerie erzeugt wird, die gewissermaßen einem einfachen Grundtypus entspricht. In den verschiedenen invasiven Stadien könnte dieser Grundtypus entsprechend modifiziert werden. Beispielsweise könnte in Merozoiten eine Spezialisierung auf

Substrate, sprich erythrozytäre Oberflächenproteine stattgefunden haben; wohingegen beim Sporozoiten dauerhafte Lokomotion im Vordergrund stand.

Diese Hypothese sieht also den Grund für den recht einheitlichen Phänotyp nach der Depletion von TRAP, S6 und CP β darin, dass alle Proteine Teil der gleichen Spezialisierung der Motormaschinerie sind. Im Fall von Oberflächenproteinen ist es leicht vorstellbar, dass sie für effiziente Lokomotion modifiziert werden müssen: beispielsweise wäre eine zu starke Adhäsion von Nachteil, sodass die adhäsiven Eigenschaften angepasst werden müssen.

Wahrscheinlich muss auch die Regulation von Actin für die besondere Lokomotion der Sporozoiten angepasst werden. Für die schnelle Migration über größere Distanzen werden höchstwahrscheinlich kurze und in ihrer Lebensdauer exakt regulierte Filamente benötigt. Dabei sollte die Lebensdauer der Zeit entsprechen, die benötigt wird um während der *gliding motility* ein Filament entlang der Sporozoitenlängsachse zu verschieben. Da die Länge dieser Strecke noch weitgehend unbekannt ist, fällt es schwer eine Halbwertszeit für F-Actin im Sporozoiten abzuschätzen. Werden Filamente um Vortrieb zu generieren etwa um die halbe Länge des Sporozoiten ($\sim 5 \mu\text{m}$) verschoben und bewegt sich der Sporozoit mit ca. $10 \mu\text{m} / \text{sec}$ so ergibt sich eine grobe Halbwertszeit von nur 0,5 sec. Kurz sollten die Filamente daher sein, weil lange Filamente einen Teil der Vortriebskräfte für intramolekulare Verdrillung absorbieren würden. Wäre dies der Fall, so könnten Sporozoiten nicht derart schnell migrieren (Schuler *et al.*, 2005b). Die Filamente müssen aber mindestens so lang sein um gleichzeitig mit mehr als einem Myosin interagieren zu können.

Die Filamente müssen also schnell aufgebaut werden, über einen kurzen Zeitraum sehr stabil und rigide sein, um anschließend ebenso schnell wieder abgebaut zu werden. Durch eine hohe Konzentration von G-Actin und die Nukleation durch Formin kann ein schneller Aufbau von F-Actin gewährleistet werden. Mit Profilin und dem ungewöhnlichen ADF1 stehen Plasmodien zwei sequestrierende Proteine zur Verfügung, die eine hohe Konzentration an G-Actin etablieren können (Kursula *et al.*, 2008; Schuler *et al.*, 2005a).

Die intrinsische Instabilität von *Plasmodium* Actin ermöglicht die schnelle Depolymerisation. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kommt *PbCP* β in diesem Modell die Aufgabe eines Stabilisators zu. Unklar ist ob CP β diese Aufgabe alleine erfüllt oder z.B. als α/β Heterodimer. Es ist vorstellbar, dass die *capping*-Aktivität von CP α und / oder Formin für die unproduktive Pendelbewegung ausreicht, nicht aber für schnelle *gliding motility* über große Distanzen. Etwas Ähnliches könnte für die beiden erwähnten Invasine angenommen werden, eines alleine ist einfach nicht ausreichend um produktive Lokomotion zu gewährleisten.

Wie elementar wichtig die CP β Untereinheit bzw. ein vollständiges *capping protein* für *P. berghei* ist, zeigt sich bereits am Phänotyp in Ookineten und am äußerst ineffizienten Oocystenegress. Die Depletion von S6 und TRAP gewinnen erst im Laufe des Reifungsprozess der Sporozoiten an Einfluss (Matuschewski, 2006). Darüber hinaus führt die S6-Depletion nur zu einer deutlich verringerten Infektivität von Speicheldrüsen-assoziierten Sporozoiten nicht aber zu einer Unterbrechung des Lebenszyklus (Steinbuechel and Matuschewski, 2009).

Ein interessantes Experiment könnte untermauern, dass der *cpβ(-)* Phänotyp tatsächlich mit der *capping*-Aktivität zusammenhängt. Das aus Pilzen stammende Cytochalasin bindet wie CP an das + Ende von F-Actin und stabilisiert diese. Cytochalasin könnte möglicherweise in geringen Mengen den *cpβ(-)* Phänotyp in Sporozoiten kompensieren. Die Aussagekraft dieses Experiments ist jedoch eingeschränkt. Kann Cytochalasin nicht komplementieren so kommt eine Reihe von Gründen dafür in Frage, beispielsweise eine unterschiedliche *uncapping*-Geschwindigkeit. Es bedeutet daher nicht zwangsläufig, dass der *cpβ(-)* Phänotyp nicht auf der fehlenden *capping*-Aktivität beruht.

Vor dem Hintergrund der defizienten Lokomotion wird deutlich warum *cpβ(-)* Sporozoiten nicht mehr infektiös sind. Verschiedenen Routen der Infektion und verschiedenen Dosen vermögen es nicht eine Blutpopulation zu etablieren wenn die Sporozoiten sich nicht bewegen können (Tab. 4). Durch die Infektionsexperimente konnte aber auch gezeigt werden, dass der fatale Motilitätsdefekt der *cpβ(-)* Sporozoiten auch im Säugetier vorherrscht, wodurch die zentrale Bedeutung von CP β für effiziente Lokomotion unterstrichen wird.

Der letzte Teil der phänotypischen Analyse der *cpβ(-)* Parasiten zeigte, dass der Phänotyp komplementiert wird, wenn in der diploiden Phase des Lebenszyklus ein WT Allel vorhanden ist. Wie zuvor für LCCL / *lectin adhesive-like protein(-)* Parasiten gezeigt (Raine *et al.*, 2007), durchliefen rekombinante *cpβ(-)* Parasiten den Lebenszyklus komplett, wenn sie mit WT Parasiten gekreuzt wurden. Mittels PCR Analysen konnten rekombinante Mitteldarm- und Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten nachgewiesen werden. Diese Sporozoiten könnten darüber hinaus eine Blutstadien Population etablieren. Erstaunlicherweise waren auch Mitteldarm-assoziierte Sporozoiten, die vierzehn Tage nach der Moskitoinfektion isoliert wurden, sowie Speicheldrüsen-assoziierte Sporozoiten vom Tag dreißig infektiös für suszeptible SD-Ratten (Abb. 20). Dies spricht dafür, dass CP β über einen sehr langen Zeitraum im Sporozoiten exprimiert wird und funktional ist.

Durch die Injektion einer Mischung aus getrennt kultivierten *cpβ(-)* und WT Ookineten ins Hämocoel der Moskitos und anschließende Infektionsexperimente konnte formal gezeigt werden, dass die Komplementation tatsächlich in der diploiden Phase des Lebenszyklus stattfindet (Abb. 21). Durch die Injektion konnte sichergestellt werden, dass gleiche Mengen ins Hämocoel gelangten. Eine Membranfütterung der Ookineten wäre wegen der herabgesetzten Infektivität der *cpβ(-)* Ookineten nicht in Frage gekommen.

Die Rolle von CP α

Im Vergleich mit der Analyse der β Untereinheit, zeigte die Analyse der *PbCP α* Untereinheit eine nahezu spiegelbildliche Situation. Die Depletion von *PbCP α* in erythrozytären Stadien scheiterte trotz mehrfacher Versuche (Abb. 23). Höchstwahrscheinlich erfüllt die α Untereinheit eine essentielle Funktion in den parasitären Stadien, die Malaria verursachen. Welche Funktion dies sein könnte ist schwer abzuschätzen. Möglicherweise ist die α Untereinheit ein Teil des zuvor beschriebenen Grundtypus der Motormaschinerie. Alternativ könnte CP α eine Spezialisierung dieser Maschinerie in erythrozytären Stadien sein. Anders als für die *cpβ(-)* Parasiten ist aber auch ein essentieller Defekt

der Dynactinfunktion denkbar. In *cpβ(-)* Parasiten schien zumindest die Sekretion von Chitinasen und ECP-1 in normal zu sein. Im Zuge dieser Experimente konnte indes gezeigt werden, dass die heterologe Expression der *P. falciparum* CP α in der Lage ist für den Verlust der *P. berghei* CP α zu kompensieren. Eine Eigenschaft, die jedoch eng mit der Funktion des C-Terminus verknüpft ist. Fehlte dieser im Konstrukt für die Komplementation, so konnte keine rekombinante Parasitenpopulation nachgewiesen werden (Abb. 23). Obwohl *P. berghei* und *P. falciparum* CP α nur zu rund 50 % identisch sind, komplementierte *PfCP α* während des kompletten Lebenszyklus den Verlust der endogenen α Untereinheit (nicht gezeigte Daten).

Um die Rolle von CP α weiter aufzuklären, sollte die Lokalisierung der α Untereinheit neue Anhaltspunkte sammeln. Dazu wurden die WT Parasiten gleich zwei Mal verändert indem die endogene α Untereinheit durch die von *P. falciparum* ersetzt und indem ein fluoreszierendes Protein fusioniert wurde. Da klonale *cp $\alpha(-)::mChPfCP $\alpha$$* Parasiten isoliert wurden ist klar, dass das *mChPfCP α* Fusionsprotein zumindest die essentielle Funktion der *P. berghei* CP α übernehmen kann.

Die Untersuchung des Fluoreszenzmusters des Fusionsproteins zeigte indessen ein unerwartetes Bild. Das als cytosolisch beschriebene Protein, markierte einen Bereich oder ein Kompartiment im infizierten Erythrozyten (Abb. 26). Dieser Bereich erweckte den Eindruck auf dem Parasiten zu liegen und in das Cytosol des Erythrozyten zu ragen. Ein Kompartiment, auf das eine derartige Lokalisation zutrifft, ist das sog. tubovesikuläre Netzwerk (Haldar *et al.*, 2001). Dieses membranöse Netzwerk wird von Parasiten induziert und ist wahrscheinlich Teil der Transportmaschinerie des Parasiten im infizierten Erythrozyten. Bislang ist das tubovesikuläre Netzwerk aber ebenso wie die sog. *Maurer's clefts* aber nur in *P. falciparum* beschrieben worden. Des Weiteren ist unklar, ob das erythrozytäre Cytoskelett überhaupt am Aufbau dieser membranösen Kompartimente beteiligt ist. Denkbar wäre allerdings, dass CP α an der Rekrutierung oder der Modifikation des Filamentnetzwerks der infizierten Zelle beteiligt ist. Eine ähnliche Funktion könnte auch Toxofilin haben (s. 1.2.2). Es sequestriert G-Actin, bindet an eine Ende von Filamenten und ist in Rhoptrien lokalisiert (Bradley *et al.*, 2005; Poupel *et al.*, 2000). Diese sekretorischen Organellen entleeren ihren Inhalt während der Invasion ins Cytoplasma der Wirtszelle und wurden mit den speziellen sekretorischen Maschinerien von Bakterien verglichen, die ihrerseits Virulenzfaktoren in Wirtszellen einschleusen (Bradley and Sibley, 2007). Möglicherweise evolvierte Toxofilin um während der Invasion die Actinfilamente der Wirtszelle zu modulieren.

Um eine ähnliche Funktion für die *P. falciparum* CP α Untereinheit postulieren zu können sind jedoch noch viele weitere Experimente notwendig. Zunächst muss die Lokalisation in einer klonalen Population bestätigt werden. Der bisher einzige Klon, zeigte kein mCherry-Signal, was wahrscheinlich auf eine Mutation zurückgeführt werden kann. Eine unabhängige Bestätigung der Lokalisation durch einen Nachweis mit Antikörpern wäre der nächste Schritt. Darüber hinaus ist es wichtig die Funktionalität der α Untereinheit in diesem, möglicherweise extraparasitärem Bereich zu überprüfen. So sollte CP α ähnlich wie *T. gondii* Toxofilin in sekretorischen Organellen zu finden sein und es sollte während der Invasion in die Wirtszelle sekretiert werden. Ein Nachweis von CP α im Cytosol des Erythrozyten könnte mit einer synchronisierten Blutkultur und der spezifischen Lyse der

Erythrozytenmembran durch Saponin erreicht werden. Eine anschließende Detektion von CP α im Lysat der Erythrozyten etwa durch eine Antikörperfärbung, brächte stichhaltige Hinweise auf eine Funktion von CP α im Erythrozyten.

Eine weitere wichtige Frage wurde bislang noch nicht diskutiert, nämlich die nach der Lokalisation von PbCP α . Der Vergleich der Lokalisation des heterologen *P. falciparum* CP α und des endogenen *P. berghei* α Untereinheit in *P. berghei* könnte weitere sehr interessante Anhaltspunkte aufdecken. Handelt es sich nämlich um eine spezifische Lokalisation der *P. falciparum* α Untereinheit, so könnte P α CP α ein entscheidender Faktor für die Etablierung der extraparasitären Membransysteme sein und damit ein zentraler Virulenzfaktor. Da CP bisher stets als cytosolisches Protein beschrieben wurde, sind diese Interpretationen rein spekulativ. Es muss natürlich auch in Betracht gezogen werden, dass die Lokalisation des mChP α CP α Fusionsproteins in diesem Kompartiment physiologisch nicht relevant ist. Die Komplementation der essentiellen PbCP α Funktion spricht jedoch gegen eine nicht physiologische Lokalisation. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse fällt es schwer die essentielle Funktion von CP α in erythrozytären Stadien genauer zu benennen. Sicher ist aber, dass sie nicht von der β Untereinheit übernommen werden kann.

Die biochemische Charakterisierung des P. berghei capping protein

Die biochemische Charakterisierung der CP Untereinheiten untermauert die genetischen und parasitologischen Ergebnisse. Wie bereits für *G. gallus* CP beschreiben (Soeno *et al.*, 1998), konnten auch die CP α und β von *P. berghei* von einem Vektor ausgehend exprimiert werden. Darüber hinaus konnten aber erstmals beide Untereinheiten einzeln löslich exprimiert werden (Abb. 30). Die Identität des rekombinanten PbCP α konnte ferner mittels Massenspektroskopie bestätigt werden. Obwohl diese Experimente eine einleitende Analyse darstellen, wurden die Ergebnisse wegen ihrer Wichtigkeit in die Arbeit aufgenommen. Die einleitende Natur der biochemischen Charakterisierung lässt sich besonders an der relativen Unreinheit der rekombinant exprimierten Proteine ablesen. Auch die Unterschiede zwischen den theoretischen Größen der Proteine und den Größen der prominenten Banden bedarf weiterer Überprüfung. Dass die gesammelten Resultate aber grundsätzliche Aussagekraft besitzen, zeigen die erfolgreichen Expressionen von P α CP α/β , P α CP α und eine erneute Expression von PbCP α (unveröffentlichte Daten, Schüler *et al.*). Offenbar präzipitieren beide *P. berghei* CP Untereinheiten nicht zwangsläufig, wenn die jeweils andere Untereinheit fehlt. Diese Ergebnisse unterstützen viele zuvor getroffene Annahmen. Beispielsweise zeigte die *in silico* Modellierung, dass ein α/α bzw. β/β Homodimer theoretisch möglich ist. Die rekombinante Expression der α bzw. β Untereinheit einzeln hebt die Ergebnisse der Modellierung daher auf ein durchaus plausibles Niveau. Formell konnten jedoch Homodimere nicht gezeigt werden. Mit reineren rekombinanten Proteinen sollte diese wichtige Frage künftig zu beantworten sein, beispielsweise mit Hilfe von nativer Gelelektrophorese.

Im weiteren Verlauf der Charakterisierung konnte ferner demonstriert werden, dass beide Untereinheiten allein *capping*-Aktivität besitzen (Abb. 31 und Tab. 7). Auch die erneute Durchführung dieser Experimente ist notwendig. Besonders die relativ schlechten Polymerisationseigenschaften des

verwendeten Actins waren misslich. Dennoch konnte ein deutlicher Effekt der verschiedenen rekombinanten Proteine demonstriert werden. Besonders der Nachweise von *capping*-Aktivität einzelner Untereinheiten ist sehr wichtig. Dies konnte bislang für kein anderes *capping protein* beschreiben werden und ist ein weiteres zentrales Ergebnis dieser Arbeit. Damit ist eine Grundvoraussetzung für die Annahme erfüllt, dass CP α und CP β auch als Homodimer eine physiologisch relevante Funktion übernehmen können. Somit steht die Vermutung, dass die *P. berghei* α Untereinheit den *cp β (-)* Phänotyp teilweise kompensieren kann, auf einem soliden Fundament.

Die Daten der *PbCP α/β* Koexpression können nun auf zwei verschiedene Weisen interpretiert werden. Je nachdem ob der Heterodimer Normalfall oder Ausnahme ist, sprechen diese Daten für oder gegen einen α/α bzw. β/β Homodimer als normale Situation. Eine weitere Unsicherheit erschwert die Einordnung der Ergebnisse der *PbCP α/β* Koexpression, nämlich das Laufverhalten des verkürzten *PbCP α* Proteins. Dass es sich um *PbCP α* handelt, könnte zweifelsfrei durch Massenspektroskopie gezeigt werden (nicht gezeigte Daten). Daher besteht die Möglichkeit, dass die untere Bande der *PbCP α/β* Koexpression von *PbCP β* und / oder vom *PbCP α* Degradationsprodukt gebildet wird. Trotz dieser und anderer offener Fragen unterstützte die biochemische Analyse viele unerwartete Ergebnisse und stellte diese auf ein robustes Fundament.

Modell der Actinregulation in motilen Plasmodium Stadien

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verändert sich das Modell der Actinregulation in motilen Stadien. Wichtigste Neuerung ist die Beteiligung von CP, was durch den Phänotyp der *cp β (-)* Parasiten und die biochemische Charakterisierung abgeleitet werden kann. Somit ergibt sich folgendes, erweitertes Modell der Actinregulation (Abb. 32).

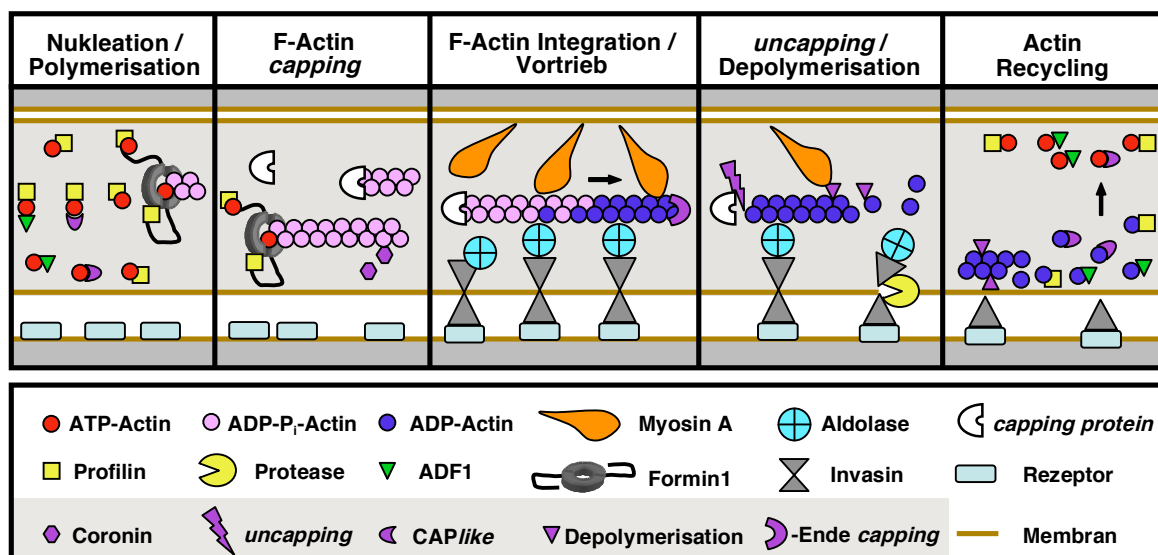


Abb. 32 Modell der Actinregulation in motilen Plasmodium Stadien. Oben sind Ausschnitte der Pellicula eines motilen Stadiums schematisch gezeigt, welches sich von rechts nach links bewegt. In den Ausschnitten sind von links nach rechts Illustrationen der regulatorischen Prozesse gezeigt, die detailliert im Text beschrieben werden. Cytosolische Bereiche sind in dunkelgrau dargestellt. Der Kortikale Raum ist hellgrau gezeigt und wird oben von der Doppelmembran des IMC und unten von der Plasmamembran des Parasiten begrenzt. Im unteren Bereich der Ausschnitte ist die Oberfläche einer Wirtszelle, die dem Parasiten als Substrat für die Lokomotion dient. Eine Legende der verwendeten Symbole ist unten gezeigt; unbekannte Faktoren, bzw. Proteine mit unbekannter Funktion sind grau unterlegt.

In Abwesenheit des Arp2/3 Komplex und Spire, katalysieren höchstwahrscheinlich Formine die Nukleation von F-Actin. Dafür können sie mit Profilin-G-Actin-Komplexen interagieren, die zunächst einen Nukleus und später ein Filament bilden. Formin1 übernimmt eine essentielle Funktion in Blutstadien (Baum *et al.*, 2008) und hat diese möglicherweise auch in anophelinen Stadien inne. Alternativ könnte diese Rolle in Ookineten und Sporozoiten von Formin2 übernommen werden. Ob die beiden *Plasmodium* Formine auch mit anderen G-Actin-sequestrierenden Proteinen interagieren können, ist unklar. Die hierfür verantwortlichen FH1 Domänen sind nur wenig konserviert. Zwei weitere Proteine kommen dafür in Frage: das unkonventionelle ADF1 und das *CAPlike* Protein. Für *Pf*ADF1 konnte gezeigt werden, dass es essentiell für die erythrozytäre Schizogonie ist und dass es den Nukleotidaustausch von ADP- zu ATP gebundenem G-Actin katalysiert (Schuler *et al.*, 2005a). Diese ADF1-G-Actin-Komplexe könnten direkt mit Formin interagieren oder Profilin konkurriert mit ADF1 um gebundenes G-Actin um es dann der Nukleation durch Formine zuzuführen. Auch *CAPlike* interagiert mit G-Actin und katalysiert wahrscheinlich den Nukleotidaustausch. Anders als ADF1 zeigen *caplike(-)* Parasiten jedoch einen Phänotyp während der Oocystenreifung. Dies schließt eine Beteiligung an der Actinregulation in motilen Stadien zwar nicht aus, jedoch demonstriert es zumindest eine bereiter gefächerte Funktion (unveröffentlichte Daten, Hliscs *et al.*). Ähnlich wie für ADF1 beschreiben könnte eine direkte Interaktion mit Formin stattfinden oder Profilin übernimmt das gebundene G-Actin und interagiert dann mit den FH1 Domänen von Formin.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte ist die Funktion von CP vital für den Parasiten. Wann welche Untereinheit bzw. welches Dimer diese Funktion ausfüllt wurde bereits ausführlich diskutiert. Für das Modell der Actinregulation stellen sich indes weitere Fragen. Beispielsweise muss Formin am + Ende der Filamente durch CP ersetzt werden, da dessen *capping*-Aktivität - zumindest im Sporozoiten - nicht ausreichend ist. Ob dabei andere regulatorische Proteine beteiligt sind ist unbekannt. Ebenso unbekannt ist die Rolle von *Plasmodium* Coronin, für das bislang nur eine Bindung an F-Actin gezeigt werden konnte (Tardieux *et al.*, 1998b).

Die Integration der Filamente in die Motormaschinerie ist heute auch nicht völlig verstanden. Bei der intrinsischen Instabilität von *Plasmodium* Actin drängt sich die Frage nach einem - Ende *capping protein* auf. Ein solches Protein scheint geradezu unabdingbar.

Wie die Desintegration des Motors von statten geht ist nicht untersucht. Eine wichtige Rolle wird das *uncapping* von F-Actin spielen. Möglicherweise wird dies von PIP₂ oder einem anderen *uncapping*-Faktor übernommen. Homologe von interagierenden Proteinen wie z.B. CARMIL konnten in *Plasmodium* nicht identifiziert werden, sodass die Steuerung der CP-Aktivität *Plasmodium* nicht verstanden ist. Darüber hinaus ist rätselhaft ob die Depolymerisation von Actin katalysiert wird; ein Kandidat hierfür wäre ADF2. Es scheint zwar in *P. berghei* keine essentielle Funktion auszufüllen aber anders als ADF1 besitzt es die F-Actin-bindende Domäne eine depolymerisierende Funktion ist nicht auszuschließen (unveröffentlichte Daten, Ganter *et al.*). Die Aktivität der beiden ADF Homologe in *Plasmodium* könnte durch die Phosphatase Chronophin reguliert werden. Die Stabilisierung der inaktiven, sprich phosphorylierten, Spezies könnte durch das 14-3-3 Protein gewährleistet werden. Wie bereits anfangs erwähnt, sind möglicherweise drei Proteine am Recycling von Actin beteiligt. Für

ADF1 konnte dies bereits gezeigt werden (Schuler *et al.*, 2005a), Profilin und das *CAPlike* Protein kommen höchstwahrscheinlich hinzu. Formell konnte dies jedoch noch nicht gezeigt werden.

Eine übergeordnete, regulatorische Funktion übernehmen höchstwahrscheinlich *calcium dependent protein kinases* (CDPK's). CDPK 3 steuert die Motilität in Ookineten (Ishino *et al.*, 2006; Siden-Kiamos *et al.*, 2006), CDPK1 ist essentiell für erythrozytäre Stadien (Kato *et al.*, 2008). Wie die Verbindung von extrazellulärem Stimulus und Actinregulation im Detail aussieht, muss indes noch geklärt werden. Auch die Funktion der *actin related proteins* (Arp) bzw. der *actin like proteins* (Alp) ist weitgehend unbekannt. Wahrscheinlich sind einige von ihnen ebenfalls an der Regulation von Actin beteiligt.

Wie sind die Ergebnisse zu bewerten?

Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmals eine funktionelle Spezifizierung bei den CP Untereinheiten. Die essentielle *capping*-Aktivität wird von α und β Untereinheit in unterschiedlichen Stadien zur Verfügung gestellt. Während CP α für eine noch unbekannte Funktion in erythrozytären Stadien unabdingbar ist, kann für produktive Lokomotion nicht auf CP β verzichtet werden.

Eine solche Situation ist mit der in höheren Eukaryoten vergleichbar. Beispielsweise exprimieren Vertebraten verschiedene Isoformen der α und β Untereinheiten in verschiedenen Geweben. (Hart *et al.*, 1997; Hurst *et al.*, 1998; Schafer *et al.*, 1994; von Bulow *et al.*, 1997). Da sich die Phänotypen bei Überexpression der somatischen CP β Isoformen der Maus stark unterscheiden, ist anzunehmen, dass sie *in vivo* verschiedene Funktionen wahrnehmen (Hart and Cooper, 1999). *In vitro* hingegen, binden sie ähnlich gut an Actin (Pappas *et al.*, 2008; Schafer *et al.*, 1994).

Für diese funktionelle Spezifizierung in *Plasmodium berghei* kommen viele Gründe in Frage. Sehr wahrscheinlich benötigten die unterschiedlichen Bewegungsmuster von Merozoiten, Ookineten und Sporozoiten eine Anpassung der *capping*-Aktivität. Möglicherweise spielt auch der Wirts- und Generationswechsel der Parasiten eine Rolle. Denkbar wäre eine Anpassung an den Wechsel vom poikilothermen Vektor auf das Säugetier und umgekehrt. Ein anderer Grund könnte die Interaktion mit dem Arp1 Minifilament des Dynactin sein. Möglicherweise spielen CP α und β verschiedene Rollen beim *capping* des Arp1 Minifilaments und F-Actin.

Mit dem *capping protein* ist ein essentieller Regulator der Mikrofilamentdynamik in *Plasmodium berghei* charakterisiert worden. Diese neuen Erkenntnisse tragen auch zum allgemeinen Verständnis der Regulation von Actin bei.

5. Literaturverzeichnis

- Akaki, M., and Dvorak, J.A. (2005) A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites. *J Exp Biol* **208**: 3211-3218.
- Akin, O., and Mullins, R.D. (2008) Capping protein increases the rate of actin-based motility by promoting filament nucleation by the Arp2/3 complex. *Cell* **133**: 841-851.
- Alano, P., Carter, R., and Ranford-Cartwright, L. (1993) *Methods in Molecular Biology. Protocols in Molecular Parasitology*. Humana Press Inc.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Alberts, A.S. (2001) Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* **276**: 2824-2830.
- Aly, A.S., and Matuschewski, K. (2005) A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med* **202**: 225-230.
- Andrews, K. and Lanzer, M. (2002) Maternal malaria: *Plasmodium falciparum* sequestration in the placenta. *Parasitol Res*: 715-723.
- Applewhite, D.A., Barzik, M., Kojima, S., Svitkina, T.M., Gertler, F.B., and Borisy, G.G. (2007) Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation. *Mol Biol Cell* **18**: 2579-2591.
- Bannister, L.H., and Mitchell, G.H. (1995) The role of the cytoskeleton in *Plasmodium falciparum* merozoite biology: an electron-microscopic view. *Ann Trop Med Parasitol* **89**: 105-111.
- Barkalow, K., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., and Hartwig, J.H. (1996) Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein. *J Cell Biol* **134**: 389-399.
- Barron-Casella, E.A., Torres, M.A., Scherer, S.W., Heng, H.H., Tsui, L.C., and Casella, J.F. (1995) Sequence analysis and chromosomal localization of human Cap Z. Conserved residues within the actin-binding domain may link Cap Z to gelsolin/severin and profilin protein families. *J Biol Chem* **270**: 21472-21479.
- Baum, J., Richard, D., Healer, J., Rug, M., Krnjajski, Z., Gilberger, T.W., Green, J.L., Holder, A.A., and 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* **281**: 5197-5208.
- Baum, J., Tonkin, C.J., Paul, A.S., Rug, M., Smith, B.J., Gould, S.B., Richard, D., Pollard, T.D., and Cowman, A.F. (2008) A malaria parasite formin regulates actin polymerization and localizes to the parasite-erythrocyte moving junction during invasion. *Cell Host Microbe* **3**: 188-198.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., and Gertler, F.B. (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* **109**: 509-521.
- Bearer, E.L. (1991) Direct observation of actin filament severing by gelsolin and binding by gCap39 and CapZ. *J Cell Biol* **115**: 1629-1638.

- Berendt, A.R., Ferguson, D.J., Gardner, J., Turner, G., Rowe, A., McCormick, C., D., R., Craig, A., Pinches, R., and Elford, B.C. (1994) Molecular Mechanisms of Sequestration in Malaria. *Parasitology* **108**: 19-28.
- Bergman, L.W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T.M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenzweig, V., and Kappe, S.H. (2003) Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *J Cell Sci* **116**: 39-49.
- Bhattacharya, N., Ghosh, S., Sept, D., and Cooper, J.A. (2006) Binding of myotrophin/V-1 to actin-capping protein: implications for how capping protein binds to the filament barbed end. *J Biol Chem* **281**: 31021-31030.
- Billker, O., Shaw, M.K., Margos, G., and Sinden, R.E. (1997) The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology* **115 (Pt 1)**: 1-7.
- Blackman, M.J., and Bannister, L.H. (2001) Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* **117**: 11-25.
- Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999) Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem* **274**: 15538-15546.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (2000a) Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**: 1007-1011.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Mullins, R.D. (2000b) Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol* **10**: 1273-1282.
- Blanchoin, L., Robinson, R.C., Choe, S., and Pollard, T.D. (2000c) Phosphorylation of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. *J Mol Biol* **295**: 203-211.
- Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (2002) Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* **41**: 597-602.
- Blandin, S., and Levashina, E.A. (2004) Mosquito immune responses against malaria parasites. *Curr Opin Immunol* **16**: 16-20.
- Bradley, Ward, C., Cheng, S., Alexander, D., Collier, S., Coombs, G., Dunn, J., Ferguson, D., Sanderson, S., Wastling, J., and Boothroyd, J. (2005) Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*: 34245-34258.
- Bradley, P.J., and Sibley, L.D. (2007) Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr Opin Microbiol* **10**: 582-587.
- Bruck, S., Huber, T.B., Ingham, R.J., Kim, K., Niederstrasser, H., Allen, P.M., Pawson, T., Cooper, J.A., and Shaw, A.S. (2006) Identification of a novel inhibitory actin-capping protein binding motif in CD2-associated protein. *J Biol Chem* **281**: 19196-19203.

- Buscaglia, C.A., Coppens, I., Hol, W.G., and Nussenzweig, V. (2003) Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium*. *Mol Biol Cell* **14**: 4947-4957.
- Canton, D.A., Olsten, M.E., Kim, K., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., Cooper, J.A., and Litchfield, D.W. (2005) The pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 is involved in regulation of cell morphology and the actin cytoskeleton and interaction with actin capping protein. *Mol Cell Biol* **25**: 3519-3534.
- Canton, D.A., Olsten, M.E., Niederstrasser, H., Cooper, J.A., and Litchfield, D.W. (2006) The role of CKIP-1 in cell morphology depends on its interaction with actin-capping protein. *J Biol Chem* **281**: 36347-36359.
- Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1986) Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry* **25**: 7789-7792.
- Carlier, M.F., Pantaloni, D., Evans, J.A., Lambooy, P.K., Korn, E.D., and Webb, M.R. (1988) The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. *FEBS Lett* **235**: 211-214.
- Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1997) Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* **269**: 459-467.
- Casella, J.F., Craig, S.W., Maack, D.J., and Brown, A.E. (1987) Cap Z(36/32), a barbed end actin-capping protein, is a component of the Z-line of skeletal muscle. *J Cell Biol* **105**: 371-379.
- Chang, F., Drubin, D., and Nurse, P. (1997) cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol* **137**: 169-182.
- Cintra, W.M., and De Souza, W. (1985) Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy of detergent extracted tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Submicrosc Cytol* **17**: 503-508.
- Clark, S.W., and Meyer, D.I. (1992) Centractin is an actin homologue associated with the centrosome. *Nature* **359**: 246-250.
- Co, C., Wong, D.T., Gierke, S., Chang, V., and Taunton, J. (2007) Mechanism of actin network attachment to moving membranes: barbed end capture by N-WASP WH2 domains. *Cell* **128**: 901-913.
- Cooke, B.M., Morris-Jones, S., Greenwood, B.M., and Nash, G.B. (1995) Mechanisms of cytoadhesion of flowing, parasitized red blood cells from Gambian children with *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* : 29-35.
- Cooper, J.A., Blum, J.D., and Pollard, T.D. (1984) *Acanthamoeba castellanii* capping protein: properties, mechanism of action, immunologic cross-reactivity, and localization. *J Cell Biol* **99**: 217-225.
- Cooper, J.A. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**: 1473-1478.
- Cooper, J.A., and Sept, D. (2008) New insights into mechanism and regulation of actin capping protein. *Int Rev Cell Mol Biol* **267**: 183-206.

- Cowman, A.F., and Crabb, B.S. (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**: 755-766.
- Cunningham, C.C., Gorlin, J.B., Kwiatkowski, D.J., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Byers, H.R., and Stossel, T.P. (1992) Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* **255**: 325-327.
- Dayel, M.J., and Mullins, R.D. (2004) Activation of Arp2/3 complex: addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2. *PLoS Biol* **2**: E91.
- De La Cruz, E.M., Mandinova, A., Steinmetz, M.O., Stoffler, D., Aebi, U., and Pollard, T.D. (2000) Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *J Mol Biol* **295**: 517-526.
- Deacon, S.W., Serpinskaya, A.S., Vaughan, P.S., Lopez Fanarraga, M., Vernos, I., Vaughan, K.T., and Gelfand, V.I. (2003) Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol* **160**: 297-301.
- Deharo, E., Coquelin, F., Chabaud, A.G., and Landau, I. (1996) The erythrocytic schizogony of two synchronized strains of *Plasmodium berghei*, NK65 and ANKA, in normocytes and reticulocytes. *Parasitol Res*: 178-182.
- Didry, D., Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1998) Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J Biol Chem* **273**: 25602-25611.
- Dobrowolski, J.M., and Sibley, L.D. (1996) *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* **84**: 933-939.
- Dobrowolski, J.M., Carruthers, V.B., and Sibley, L.D. (1997a) Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* **26**: 163-173.
- Dobrowolski, J.M., Niesman, I.R., and Sibley, L.D. (1997b) Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil Cytoskeleton* **37**: 253-262.
- Dominguez, R. (2004) Actin-binding proteins--a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci* **29**: 572-578.
- Dowse, T., and Soldati, D. (2004) Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr Opin Microbiol* **7**: 388-396.
- Drenckhahn, D., and Pollard, T.D. (1986) Elongation of actin filaments is a diffusion-limited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *J Biol Chem* **261**: 12754-12758.
- Dubremetz, J.F., and Ferreira, E. (1978) Capping of cationised ferritin by coccidian zoites. *Journal of Protozoology* **25**.
- Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P.A., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (1998) A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* **94**: 667-677.
- Echeverri, C.J., Paschal, B.M., Vaughan, K.T., and Vallee, R.B. (1996) Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J Cell Biol* **132**: 617-633.

- Eckley, D.M., Gill, S.R., Melkonian, K.A., Bingham, J.B., Goodson, H.V., Heuser, J.E., and Schroer, T.A. (1999) Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the arp1 minifilament pointed end. *J Cell Biol* **147**: 307-320.
- Eckley, D.M., and Schroer, T.A. (2003) Interactions between the evolutionarily conserved, actin-related protein, Arp11, actin, and Arp1. *Mol Biol Cell* **14**: 2645-2654.
- Eddy, R.J., Han, J., and Condeelis, J.S. (1997) Capping protein terminates but does not initiate chemoattractant-induced actin assembly in Dictyostelium. *J Cell Biol* **139**: 1243-1253.
- Faix, J., and Rottner, K. (2006) The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 18-25.
- Field, S.J., Pinder, J.C., Clough, B., Dluzewski, A.R., Wilson, R.J., and Gratzler, W.B. (1993) Actin in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Cell Motil Cytoskeleton* **25**: 43-48.
- Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G., and Way, M. (1999) Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* **401**: 926-929.
- Ganter (2005) Genetische Charakterisierung des actin capping Proteins in *Plasmodium berghei*. In *Fakultät für Biowissenschaften*. Vol. Diplom Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität.
- Gantt, S., Persson, C., Rose, K., Birkett, A.J., Abagyan, R., and Nussenzweig, V. (2000) Antibodies against thrombospondin-related anonymous protein do not inhibit *Plasmodium* sporozoite infectivity in vivo. *Infect Immun* **68**: 3667-3673.
- 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., Perte, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., and Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498-511.
- Garner, E.C., Campbell, C.S., and Mullins, R.D. (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* **306**: 1021-1025.
- Gill, S.R., Schroer, T.A., Szilak, I., Steuer, E.R., Sheetz, M.P., and Cleveland, D.W. (1991) Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **115**: 1639-1650.
- Gohla, A., and Bokoch, G.M. (2002) 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr Biol* **12**: 1704-1710.
- Gohla, A., Birkenfeld, J., and Bokoch, G.M. (2005) Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat Cell Biol* **7**: 21-29.
- Goode, B.L., and Eck, M.J. (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* **76**: 593-627.

- Gordon, J.L., and Sibley, L.D. (2005) Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics* **6**: 179.
- Gordon, J.L., Beatty, W.L., and Sibley, L.D. (2008) A novel actin-related protein is associated with daughter cell formation in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* **7**: 1500-1512.
- Gouin, E., Gantelet, H., Egile, C., Lasa, I., Ohayon, H., Villiers, V., Gounon, P., Sansonetti, P.J., and Cossart, P. (1999) A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci* **112 (Pt 11)**: 1697-1708.
- Gouin, E., Egile, C., Dehoux, P., Villiers, V., Adams, J., Gertler, F., Li, R., and Cossart, P. (2004) The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature* **427**: 457-461.
- Green, J.L., Martin, S.R., Fielden, J., Ksagoni, A., Grainger, M., Yim Lim, B.Y., Molloy, J.E., and Holder, A.A. (2006) The MTIP-myosin A complex in blood stage malaria parasites. *J Mol Biol* **355**: 933-941.
- Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
- Haldar, K., Samuel, B., Mohandas, N., Harrison, T., and Hiller, N. (2001) Transport mechanisms in *Plasmodium*-infected erythrocytes: lipid rafts and a tubovesicular network. *International Journal for Parasitology*: 1393-1401
- Hart, M.C., Korshunova, Y.O., and Cooper, J.A. (1997a) Mapping of the mouse actin capping protein alpha subunit genes and pseudogenes. *Genomics* **39**: 264-270.
- Hart, M.C., Korshunova, Y.O., and Cooper, J.A. (1997b) Vertebrates have conserved capping protein alpha isoforms with specific expression patterns. *Cell Motil Cytoskeleton* **38**: 120-132.
- Hart, M.C., and Cooper, J.A. (1999) Vertebrate isoforms of actin capping protein beta have distinct functions In vivo. *J Cell Biol* **147**: 1287-1298.
- Heintzelman, M.B., and Schwartzman, J.D. (1997) A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J Mol Biol* **271**: 139-146.
- Heiss, S.G., and Cooper, J.A. (1991) Regulation of CapZ, an actin capping protein of chicken muscle, by anionic phospholipids. *Biochemistry* **30**: 8753-8758.
- Hertzog, M., van Heijenoort, C., Didry, D., Gaudier, M., Coutant, J., Gigant, B., Didelot, G., Preat, T., Knossow, M., Guittet, E., and Carlier, M.F. (2004) The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly. *Cell* **117**: 611-623.
- Higgs, H.N., Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999) Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* **38**: 15212-15222.
- Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2000) Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **150**: 1311-1320.
- Holleran, E.A., Ligon, L.A., Tokito, M., Stankewich, M.C., Morrow, J.S., and Holzbaur, E.L. (2001) beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J Biol Chem* **276**: 36598-36605.

- Hug, C., Jay, P.Y., Reddy, I., McNally, J.G., Bridgman, P.C., Elson, E.L., and Cooper, J.A. (1995) Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in dictyostelium. *Cell* **81**: 591-600.
- Hurst, S., Howes, E.A., Coadwell, J., and Jones, R. (1998) Expression of a testis-specific putative actin-capping protein associated with the developing acrosome during rat spermiogenesis. *Mol Reprod Dev* **49**: 81-91.
- Hutchings, N.J., Clarkson, N., Chalkley, R., Barclay, A.N., and Brown, M.H. (2003) Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *J Biol Chem* **278**: 22396-22403.
- Isenberg, G., Aebi, U., and Pollard, T.D. (1980) An actin-binding protein from *Acanthamoeba* regulates actin filament polymerization and interactions. *Nature* **288**: 455-459.
- Ishino, T., Orito, Y., Chinzei, Y., and Yuda, M. (2006) A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol Microbiol* **59**: 1175-1184.
- Iwasa, J.H., and Mullins, R.D. (2007) Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr Biol* **17**: 395-406.
- Janse, C.J., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., and Waters, A.P. (2006) High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol Biochem Parasitol* **145**: 60-70.
- Jeng, R.L., Goley, E.D., D'Alessio, J.A., Chaga, O.Y., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Heinzen, R.A., and Welch, M.D. (2004) A *Rickettsia* WASP-like protein activates the Arp2/3 complex and mediates actin-based motility. *Cell Microbiol* **6**: 761-769.
- Jewett, T.J., and Sibley, L.D. (2003) Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol Cell* **11**: 885-894.
- Jin, Y., Kebaier, C., and Vanderberg, J. (2007) Direct microscopic quantification of dynamics of *Plasmodium berghei* sporozoite transmission from mosquitoes to mice. *Infect Immun* **75**: 5532-5539.
- Jung, G., Remmert, K., Wu, X., Volosky, J.M., and Hammer, J.A., 3rd (2001) The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol* **153**: 1479-1497.
- Kahana, J.A., Schlenstedt, G., Evanchuk, D.M., Geiser, J.R., Hoyt, M.A., and Silver, P.A. (1998) The yeast dynactin complex is involved in partitioning the mitotic spindle between mother and daughter cells during anaphase B. *Mol Biol Cell* **9**: 1741-1756.
- Kaiser, D.A., Vinson, V.K., Murphy, D.B., and Pollard, T.D. (1999) Profilin is predominantly associated with monomeric actin in *Acanthamoeba*. *J Cell Sci* **112** (Pt 21): 3779-3790.
- Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D.G. (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**: 475-487.
- Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., and Menard, R. (1999) Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol* **147**: 937-944.

- Kappe, S.H., Buscaglia, C.A., and Nussenzweig, V. (2004) *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 29-59.
- Karki, S., and Holzbaur, E.L. (1995) Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. *J Biol Chem* **270**: 28806-28811.
- Karki, S., LaMonte, B., and Holzbaur, E.L. (1998) Characterization of the p22 subunit of dynactin reveals the localization of cytoplasmic dynein and dynactin to the midbody of dividing cells. *J Cell Biol* **142**: 1023-1034.
- Kato, M., Sasaki, M., Mizuno, S., and Harata, M. (2001) Novel actin-related proteins in vertebrates: similarities of structure and expression pattern to Arp6 localized on *Drosophila* heterochromatin. *Gene* **268**: 133-140.
- Kato, N., Sakata, T., Breton, G., Le Roch, K.G., Nagle, A., Andersen, C., Bursulaya, B., Henson, K., Johnson, J., Kumar, K.A., Marr, F., Mason, D., McNamara, C., Plouffe, D., Ramachandran, V., Spooner, M., Tuntland, T., Zhou, Y., Peters, E.C., Chatterjee, A., Schultz, P.G., Ward, G.E., Gray, N., Harper, J., and Winzeler, E.A. (2008) Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. *Nat Chem Biol* **4**: 347-356.
- Kelly, A.E., Kranitz, H., Dotsch, V., and Mullins, R.D. (2006) Actin binding to the central domain of WASP/Scar proteins plays a critical role in the activation of the Arp2/3 complex. *J Biol Chem* **281**: 10589-10597.
- Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A., and Rosen, M.K. (2000) Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**: 151-158.
- Kim, K., Yamashita, A., Wear, M.A., Maeda, Y., and Cooper, J.A. (2004) Capping protein binding to actin in yeast: biochemical mechanism and physiological relevance. *J Cell Biol* **164**: 567-580.
- Kim, K., McCully, M.E., Bhattacharya, N., Butler, B., Sept, D., and Cooper, J.A. (2007) Structure/function analysis of the interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with actin-capping protein: implications for how capping protein binds the actin filament. *J Biol Chem* **282**: 5871-5879.
- King, S.J., and Schroer, T.A. (2000) Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* **2**: 20-24.
- King, S.J., Brown, C.L., Maier, K.C., Quintyne, N.J., and Schroer, T.A. (2003) Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. *Mol Biol Cell* **14**: 5089-5097.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992) *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* **68**: 521-531.
- Kooij, T.W., and Matuschewski, K. (2007) Triggers and tricks of *Plasmodium* sexual development. *Curr Opin Microbiol* **10**: 547-553.
- Kovar, D.R., Kuhn, J.R., Tichy, A.L., and Pollard, T.D. (2003) The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol* **161**: 875-887.

- Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2006) Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* **124**: 423-435.
- Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J., and Gertler, F.B. (2003) Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 541-564.
- Kursula, I., Kursula, P., Ganter, M., Panjikar, S., Matuschewski, K., and Schuler, H. (2008) Structural Basis for Parasite-Specific Functions of the Divergent Profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure* **16**: 1638-1648.
- Lambrechts, A., Gevaert, K., Cossart, P., Vandekerckhove, J., and Van Troys, M. (2008) Listeria comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends Cell Biol* **18**: 220-227.
- Lammers, M., Rose, R., Scrima, A., and Wittinghofer, A. (2005) The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by Rho*GTP. *Embo J* **24**: 4176-4187.
- Lane, J.D., Vergnolle, M.A., Woodman, P.G., and Allan, V.J. (2001) Apoptotic cleavage of cytoplasmic dynein intermediate chain and p150(Glued) stops dynein-dependent membrane motility. *J Cell Biol* **153**: 1415-1426.
- Lanzer, Fischer, and Stich (2000) Die Überlebensstrategie des Malariaerregers. *Biologie in unserer Zeit* **30**: 194-201.
- Lappalainen, P., Fedorov, E.V., Fedorov, A.A., Almo, S.C., and Drubin, D.G. (1997) Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis. *Embo J* **16**: 5520-5530.
- Le Clainche, C., and Carlier, M.F. (2008) Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* **88**: 489-513.
- Lewis, A.K., and Bridgman, P.C. (1992) Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol* **119**: 1219-1243.
- Li, F., and Higgs, H.N. (2003) The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol* **13**: 1335-1340.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999) Reconstitution of actin-based motility of Listeria and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**: 613-616.
- Lommel, S., Benesch, S., Rottner, K., Franz, T., Wehland, J., and Kuhn, R. (2001) Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep* **2**: 850-857.
- Lu, J., and Pollard, T.D. (2001) Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol Biol Cell* **12**: 1161-1175.
- Lucius, and Loos-Frank (1997) *Parasitologie*. : Spektrum Akademischer Verlag.
- Machesky, L.M., and Insall, R.H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* **8**: 1347-1356.
- Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D. (1999) Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3739-3744.

- Maciver, S.K., Zot, H.G., and Pollard, T.D. (1991) Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* **115**: 1611-1620.
- Makino, S., Sasakawa, C., Kamata, K., Kurata, T., and Yoshikawa, M. (1986) A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in *S. flexneri* 2a. *Cell* **46**: 551-555.
- Maly, I.V., and Borisy, G.G. (2001) Self-organization of a propulsive actin network as an evolutionary process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11324-11329.
- Marchand, J.B., Kaiser, D.A., Pollard, T.D., and Higgs, H.N. (2001) Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* **3**: 76-82.
- Maruyama, K., and Obinata, T. (1965) Presence of Beta-Actinin in the Soluble Fraction of the Muscle Cells of the Chick Embryo. *J Biochem* **57**: 575-577.
- Maruyama, K. (2002) beta-Actinin, Cap Z, connectin and titin: what's in a name? *Trends Biochem Sci* **27**: 264-266.
- Mattila, P.K., Quintero-Monzon, O., Kugler, J., Moseley, J.B., Almo, S.C., Lappalainen, P., and Goode, B.L. (2004) A high-affinity interaction with ADP-actin monomers underlies the mechanism and in vivo function of Srv2/cyclase-associated protein. *Mol Biol Cell* **15**: 5158-5171.
- Matuschewski, K., Mota, M.M., Pinder, J.C., Nussenzweig, V., and Kappe, S.H. (2001) Identification of the class XIV myosins Pb-MyoA and Py-MyoA and expression in *Plasmodium* sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* **112**: 157-161.
- Matuschewski, K., Nunes, A.C., Nussenzweig, V., and Menard, R. (2002a) *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *Embo J* **21**: 1597-1606.
- Matuschewski, K., Ross, J., Brown, S.M., Kaiser, K., Nussenzweig, V., and Kappe, S.H. (2002b) Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage. *J Biol Chem* **277**: 41948-41953.
- Matuschewski, K. (2006) Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector. *Cell Microbiol* **8**: 1547-1556.
- Matuschewski, K., and Schuler, H. (2008) Actin/myosin-based gliding motility in apicomplexan parasites. *Subcell Biochem* **47**: 110-120.
- May, R.C., Caron, E., Hall, A., and Machesky, L.M. (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat Cell Biol* **2**: 246-248.
- Mehlhorn, and Piekarski (2002) *Grundriß der Parasitenkunde*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Meissner, M., Schluter, D., and Soldati, D. (2002) Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* **298**: 837-840.
- Mejillano, M.R., Kojima, S., Applewhite, D.A., Gertler, F.B., Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (2004) Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* **118**: 363-373.
- Menard, R., and Janse, C. (1997) Gene targeting in malaria parasites. *Methods* **13**: 148-157.

- Menendez, C. (1995) Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. **Parasitol. Today**: 187-193.
- Merrifield, C.J., Moss, S.E., Ballestrem, C., Imhof, B.A., Giese, G., Wunderlich, I., and Almers, W. (1999) Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol* **1**: 72-74.
- Merrifield, C.J., Qualmann, B., Kessels, M.M., and Almers, W. (2004) Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* **83**: 13-18.
- Miki, H., and Takenawa, T. (1998) Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun* **243**: 73-78.
- Miller, L.H., Aikawa, M., Johnson, J.G., and Shiroishi, T. (1979) Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J Exp Med* **149**: 172-184.
- Miyoshi, T., Tsuji, T., Higashida, C., Hertzog, M., Fujita, A., Narumiya, S., Scita, G., and Watanabe, N. (2006) Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing. *J Cell Biol* **175**: 947-955.
- Mizuno, Y., Makioka, A., Kawazu, S., Kano, S., Kawai, S., Akaki, M., Aikawa, M., and Ohtomo, H. (2002) Effect of jasplakinolide on the growth, invasion, and actin cytoskeleton of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* **88**: 844-848.
- Mogilner, A., and Oster, G. (1996) Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J* **71**: 3030-3045.
- Moore, J.K., Li, J., and Cooper, J.A. (2008) Dynactin function in mitotic spindle positioning. *Traffic* **9**: 510-527.
- Morrisette, N.S., and Sibley, L.D. (2002) Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 21-38; table of contents.
- Muller, J., Oma, Y., Vallar, L., Friederich, E., Poch, O., and Winsor, B. (2005) Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins. *Mol Biol Cell* **16**: 5736-5748.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6181-6186.
- Narita, A., Takeda, S., Yamashita, A., and Maeda, Y. (2006) Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study. *Embo J* **25**: 5626-5633.
- Narita, A., and Maeda, Y. (2007) Molecular determination by electron microscopy of the actin filament end structure. *J Mol Biol* **365**: 480-501.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., and Uemura, T. (2002) Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* **108**: 233-246.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**: 456-459.

- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., and Rosen, M.K. (2005) Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**: 488-494.
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., and Carlier, M.F. (2000) The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol* **2**: 385-391.
- Pappas, C.T., Bhattacharya, N., Cooper, J.A., and Gregorio, C.C. (2008) Nebulin Interacts with CapZ and Regulates Thin Filament Architecture within the Z-Disc. *Mol Biol Cell* **19**: 1837-1847.
- Paschal, B.M., Holzbaur, E.L., Pfister, K.K., Clark, S., Meyer, D.I., and Vallee, R.B. (1993) Characterization of a 50-kDa polypeptide in cytoplasmic dynein preparations reveals a complex with p150GLUED and a novel actin. *J Biol Chem* **268**: 15318-15323.
- Paul, A.S., and Pollard, T.D. (2008) The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation. *Curr Biol* **18**: 9-19.
- Pinder, J.C., Fowler, R.E., Dluzewski, A.R., Bannister, L.H., Lavin, F.M., Mitchell, G.H., Wilson, R.J., and Gratzner, W.B. (1998) Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *J Cell Sci* **111** (Pt 13): 1831-1839.
- Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M.F., Sher, A., and Soldati-Favre, D. (2008) *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* **3**: 77-87.
- Ploubidou, A., and Way, M. (2001) Viral transport and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 97-105.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**: 453-465.
- Pollard, T.D. (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**: 451-477.
- Poupel, O., and Tardieux, I. (1999) *Toxoplasma gondii* motility and host cell invasiveness are drastically impaired by jasplakinolide, a cyclic peptide stabilizing F-actin. *Microbes Infect* **1**: 653-662.
- Poupel, O., Boleti, H., Axisa, S., Couture-Tosi, E., and Tardieux, I. (2000) Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Mol Biol Cell* **11**: 355-368.
- Pradel, G., and Frevert, U. (2001) Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* **33**: 1154-1165.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmund, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002) Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**: 612-615.
- Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B.H., Holzbaur, E.L., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M.K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S.J., Brown, R.H., Jr., Ludlow, C.L., and Fischbeck, K.H. (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* **33**: 455-456.

- Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E., and Mullins, R.D. (2005) Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* **433**: 382-388.
- Raine, J.D., Ecker, A., Mendoza, J., Tewari, R., Stanway, R.R., and Sinden, R.E. (2007) Female inheritance of malarial lap genes is essential for mosquito transmission. *PLoS Pathog* **3**: e30.
- Rengan, R., and Ochs, H.D. (2000) Molecular biology of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Rev Immunogenet* **2**: 243-255.
- Riehemann, K., and Sorg, C. (1993) Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins. *Trends Biochem Sci* **18**: 82-83.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., and Pollard, T.D. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* **294**: 1679-1684.
- Rodriguez, M.H., and Hernandez-Hernandez Fde, L. (2004) Insect-malaria parasites interactions: the salivary gland. *Insect Biochem Mol Biol* **34**: 615-624.
- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., and Mayer, B.J. (2001) Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem* **276**: 26448-26452.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (2004) Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**: 419-429.
- Romero, S., Didry, D., Larquet, E., Boisset, N., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (2007) How ATP hydrolysis controls filament assembly from profilin-actin: implication for formin processivity. *J Biol Chem* **282**: 8435-8445.
- Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M.R., and Wittinghofer, A. (2005) Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* **435**: 513-518.
- Rosenblatt, J., Peluso, P., and Mitchison, T.J. (1995) The bulk of unpolymerized actin in Xenopus egg extracts is ATP-bound. *Mol Biol Cell* **6**: 227-236.
- Rozelle, A.L., Machesky, L.M., Yamamoto, M., Driessens, M.H., Insall, R.H., Roth, M.G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., and Yin, H.L. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* **10**: 311-320.
- Rybakin, V., and Clemen, C.S. (2005) Coronin proteins as multifunctional regulators of the cytoskeleton and membrane trafficking. *Bioessays* **27**: 625-632.
- Sahoo, N., Beatty, W., Heuser, J., Sept, D., and Sibley, L.D. (2006) Unusual kinetic and structural properties control rapid assembly and turnover of actin in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell* **17**: 895-906.
- Schafer, D.A., Waddle, J.A., and Cooper, J.A. (1993) Localization of CapZ during myofibrillogenesis in cultured chicken muscle. *Cell Motil Cytoskeleton* **25**: 317-335.
- Schafer, D.A., Gill, S.R., Cooper, J.A., Heuser, J.E., and Schroer, T.A. (1994a) Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *J Cell Biol* **126**: 403-412.

- Schafer, D.A., Korshunova, Y.O., Schroer, T.A., and Cooper, J.A. (1994b) Differential localization and sequence analysis of capping protein beta-subunit isoforms of vertebrates. *J Cell Biol* **127**: 453-465.
- Schatten, H., Sibley, L.D., and Ris, H. (2003) Structural evidence for actin-like filaments in *Toxoplasma gondii* using high-resolution low-voltage field emission scanning electron microscopy. *Microsc Microanal* **9**: 330-335.
- Scheller, L.F., Wirtz, R.A., and Azad, A.F. (1994) Susceptibility of different strains of mice to hepatic infection with *Plasmodium berghei*. *Infect Immun* **62**: 4844-4847.
- Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Stradal, T.E., Schleicher, M., and Faix, J. (2006) The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7694-7699.
- Schmitz, S., Grainger, M., Howell, S., Calder, L.J., Gaeb, M., Pinder, J.C., Holder, A.A., and Veigel, C. (2005) Malaria parasite actin filaments are very short. *J Mol Biol* **349**: 113-125.
- Schroer, T.A. (2004) Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 759-779.
- Schuler, H., Mueller, A.K., and Matuschewski, K. (2005a) A *Plasmodium* actin-depolymerizing factor that binds exclusively to actin monomers. *Mol Biol Cell* **16**: 4013-4023.
- Schuler, H., Mueller, A.K., and Matuschewski, K. (2005b) Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS Lett* **579**: 655-660.
- Schuler, H., and Matuschewski, K. (2006a) *Plasmodium* motility: actin not actin' like actin. *Trends Parasitol* **22**: 146-147.
- Schuler, H., and Matuschewski, K. (2006b) Regulation of apicomplexan microfilament dynamics by a minimal set of actin-binding proteins. *Traffic* **7**: 1433-1439.
- Shaw, M.K., and Tilney, L.G. (1999) Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9095-9099.
- Shen, X., Ranallo, R., Choi, E., and Wu, C. (2003) Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell* **12**: 147-155.
- Sherman, I.W. (1998) *Malaria. Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*. Washington, DC American Society for Microbiology Press.
- Shih, N.Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M.L., Kanagawa, O., Miner, J.H., and Shaw, A.S. (1999) Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* **286**: 312-315.
- Shu, X., Shaner, N.C., Yarbrough, C.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (2006) Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* **45**: 9639-9647.
- Siden-Kiamos, I., Ecker, A., Nyback, S., Louis, C., Sinden, R.E., and Billker, O. (2006a) *Plasmodium berghei* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol Microbiol* **60**: 1355-1363.

- Siden-Kiamos, I., Pinder, J.C., and Louis, C. (2006b) Involvement of actin and myosins in *Plasmodium berghei* ookinete motility. *Mol Biochem Parasitol* **150**: 308-317.
- Sinden, R.E., Dawes, E.J., Alavi, Y., Waldock, J., Finney, O., Mendoza, J., Butcher, G.A., Andrews, L., Hill, A.V., Gilbert, S.C., and Basanez, M.G. (2007) Progression of *Plasmodium berghei* through *Anopheles stephensi* is density-dependent. *PLoS Pathog* **3**: e195.
- Sizonenko, G.I., Karpova, T.S., Gattermeir, D.J., and Cooper, J.A. (1996) Mutational analysis of capping protein function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **7**: 1-15.
- Skoble, J., Portnoy, D.A., and Welch, M.D. (2000) Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol* **150**: 527-538.
- Small, J.V., and Celis, J.E. (1978) Filament arrangements in negatively stained cultured cells: the organization of actin. *Cytobiologie* **16**: 308-325.
- Smith, G.A., Portnoy, D.A., and Theriot, J.A. (1995) Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility. *Mol Microbiol* **17**: 945-951.
- Smythe, W.A., Joiner, K.A., and Hoppe, H.C. (2008) Actin is required for endocytic trafficking in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol* **10**: 452-464.
- Soeno, Y., Abe, H., Kimura, S., Maruyama, K., and Obinata, T. (1998) Generation of functional beta-actinin (CapZ) in an *E. coli* expression system. *J Muscle Res Cell Motil* **19**: 639-646.
- Staiger, C.J., and Blanchoin, L. (2006) Actin dynamics: old friends with new stories. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 554-562.
- Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., and Stradal, T.E. (2006) Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell* **17**: 2581-2591.
- Steinbuechel, M., and Matuschewski, K. (2009) Role for the *Plasmodium* sporozoite-specific transmembrane protein S6 in parasite motility and efficient malaria transmission. *Cell Microbiol* **11**: 279-288.
- Stevens, J.M., Galyov, E.E., and Stevens, M.P. (2006) Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**: 91-101.
- Storch, and Welch (1997) *Systematische Zoologie*: Gustav Fischer Verlag.
- Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S., and Menard, R. (1997) TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *plasmodium* sporozoites. *Cell* **90**: 511-522.
- Sun, H.Q., Wooten, D.C., Janmey, P.A., Yin, H.L. (1994) The actin side-binding domain of gelsolin also caps actin filaments. Implications for actin filament severing. *J Biol Chem* **269**: 9473-9479.
- Suzuki, T., Miki, H., Takenawa, T., and Sasakawa, C. (1998) Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella flexneri*. *Embo J* **17**: 2767-2776.
- Svitkina, T.M., Verkhovskiy, A.B., McQuade, K.M., and Borisy, G.G. (1997) Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol* **139**: 397-415.

- Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* **145**: 1009-1026.
- Tardieux, I., Baines, I., Mossakowska, M., and Ward, G.E. (1998a) Actin-binding proteins of invasive malaria parasites and the regulation of actin polymerization by a complex of 32/34-kDa proteins associated with heat shock protein 70kDa. *Mol Biochem Parasitol* **93**: 295-308.
- Tardieux, I., Liu, X., Poupel, O., Parzy, D., Dehoux, P., and Langsley, G. (1998b) A *Plasmodium falciparum* novel gene encoding a coronin-like protein which associates with actin filaments. *FEBS Lett* **441**: 251-256.
- Thathy, V., and Menard, R. (2002) Gene targeting in *Plasmodium berghei*. *Methods Mol Med* **72**: 317-331.
- Torres, E., and Rosen, M.K. (2003) Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol Cell* **11**: 1215-1227.
- Urano, T., Remmert, K., and Hammer, J.A., 3rd (2006) CARMIL is a potent capping protein antagonist: identification of a conserved CARMIL domain that inhibits the activity of capping protein and uncaps capped actin filaments. *J Biol Chem* **281**: 10635-10650.
- van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J., and Sykes, C. (2005) Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7847-7852.
- van der Wel, A.M., Tomas, A.M., Kocken, C.H., Malhotra, P., Janse, C.J., Waters, A.P., and Thomas, A.W. (1997) Transfection of the primate malaria parasite *Plasmodium knowlesi* using entirely heterologous constructs. *J Exp Med* **185**: 1499-1503.
- van Dijk, M.R., Waters, A.P., and Janse, C.J. (1995) Stable transfection of malaria parasite blood stages. *Science* **268**: 1358-1362.
- van Dijk, M.R., Janse, C.J., and Waters, A.P. (1996) Expression of a *Plasmodium* gene introduced into subtelomeric regions of *Plasmodium berghei* chromosomes. *Science* **271**: 662-665.
- Van Kirk, L.S., Hayes, S.F., and Heinzen, R.A. (2000) Ultrastructure of *Rickettsia rickettsii* actin tails and localization of cytoskeletal proteins. *Infect Immun* **68**: 4706-4713.
- Vandekerckhove, J., Deboben, A., Nassal, M., and Wieland, T. (1985) The phalloidin binding site of F-actin. *Embo J* **4**: 2815-2818.
- Vanderberg, J.P. (1974) Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites. *J Protozool* **21**: 527-537.
- Vaughan, K.T., and Vallee, R.B. (1995) Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J Cell Biol* **131**: 1507-1516.
- Vaughan, P.S., Miura, P., Henderson, M., Byrne, B., Vaughan, K.T. (2002) A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport. *J Cell Biol* **158**: 305-319.
- Vinson, V.K., De La Cruz, E.M., Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (1998) Interactions of *Acanthamoeba* profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry* **37**: 10871-10880.
- Vlachou, D., Zimmermann, T., Cantera, R., Janse, C.J., Waters, A.P., and Kafatos, F.C. (2004) Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol* **6**: 671-685.

- Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A., and Kafatos, F.C. (2006) The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev* **16**: 384-391.
- von Bulow, M., Rackwitz, H.R., Zimbelmann, R., and Franke, W.W. (1997) CP beta3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res* **233**: 216-224.
- Vorobiev, S., Strokopytov, B., Drubin, D.G., Frieden, C., Ono, S., Condeelis, J., Rubenstein, P.A., and Almo, S.C. (2003) The structure of nonvertebrate actin: implications for the ATP hydrolytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5760-5765.
- Wahlgren, M., Carlson, J., Helmby, H., Hedlund, I., and Treutiger, C.J. (1992) Molecular mechanisms and biological importance of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*: 323-329.
- Wallar, B.J., and Alberts, A.S. (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **13**: 435-446.
- Wallar, B.J., Stropich, B.N., Schoenherr, J.A., Holman, H.A., Kitchen, S.M., and Alberts, A.S. (2006) The basic region of the diaphanous-autoregulatory domain (DAD) is required for autoregulatory interactions with the diaphanous-related formin inhibitory domain. *J Biol Chem* **281**: 4300-4307.
- Wang, W., Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (2005) Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol* **15**: 138-145.
- Waterman-Storer, C.M., Karki, S., and Holzbaur, E.L. (1995) The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1634-1638.
- Waters, A.P., van Spaendonk, R.M., Ramesar, J., Vervenne, R.A., Dirks, R.W., Thompson, J., and Janse, C.J. (1997) Species-specific regulation and switching of transcription between stage-specific ribosomal RNA genes in *Plasmodium berghei*. *J Biol Chem* **272**: 3583-3589.
- Wear, M.A., Yamashita, A., Kim, K., Maeda, Y., and Cooper, J.A. (2003) How capping protein binds the barbed end of the actin filament. *Curr Biol* **13**: 1531-1537.
- Wear, M.A., and Cooper, J.A. (2004) Capping protein binding to S100B: implications for the tentacle model for capping the actin filament barbed end. *J Biol Chem* **279**: 14382-14390.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T.J. (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**: 265-269.
- Wenk, and Renz (2003) *Parasitologie Biologie der Humanparasiten*: Thieme.
- Wesseling, J.G., de Ree, J.M., Ponnudurai, T., Smits, M.A., and Schoenmakers, J.G. (1988) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a *Plasmodium falciparum* actin gene. *Mol Biochem Parasitol* **27**: 313-320.
- Wesseling, J.G., Snijders, P.J., van Someren, P., Jansen, J., Smits, M.A., and Schoenmakers, J.G. (1989) Stage-specific expression and genomic organization of the actin genes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **35**: 167-176.

- Wetzel, D.M., Hakansson, S., Hu, K., Roos, D., and Sibley, L.D. (2003) Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol Biol Cell* **14**: 396-406.
- Wu, Y., Kirkman, L.A., and Wellems, T.E. (1996) Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1130-1134.
- Xu, J., Casella, J.F., and Pollard, T.D. (1999) Effect of capping protein, CapZ, on the length of actin filaments and mechanical properties of actin filament networks. *Cell Motil Cytoskeleton* **42**: 73-81.
- Xu, Y., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L., Eck, M.J. (2004) Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* **116**: 711-723.
- Yamashita, A., Maeda, K., and Maeda, Y. (2003) Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *Embo J* **22**: 1529-1538.
- Yang, C., Huang, M., DeBiasio, J., Pring, M., Joyce, M., Miki, H., Takenawa, T., and Zigmond, S.H. (2000) Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization. *J Cell Biol* **150**: 1001-1012.
- Yang, C., Pring, M., Wear, M.A., Huang, M., Cooper, J.A., Svitkina, T.M., and Zigmond, S.H. (2005) Mammalian CARMIL inhibits actin filament capping by capping protein. *Dev Cell* **9**: 209-221.
- Yang, H.C., and Pon, L.A. (2002) Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 751-756.
- Yarmola, E.G., and Bubb, M.R. (2006) Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. *Trends Biochem Sci* **31**: 197-205.
- Yarovinsky, F., and Sher, A. (2006) Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **36**: 255-259.
- Zalevsky, J., Grigorova, I., and Mullins, R.D. (2001) Activation of the Arp2/3 complex by the *Listeria* acta protein. Acta binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex. *J Biol Chem* **276**: 3468-3475.
- Zigmond, S.H., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Dar, A.C., Sicheri, F., Forkey, J., and Pring, M. (2003) Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol* **13**: 1820-1823.

6. Appendix

6.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium*

Der komplexe Lebenszyklus der Plasmodien, in dem neben einem Wirts- auch ein Generationswechsel zu finden ist, lässt sich in drei Phasen teilen: Zunächst eine geschlechtliche Phase, die im Säuger beginnt und im Vektor vollendet wird (Gamogonie). Daran schließt sich eine ungeschlechtliche Sporogonie an, die vollständig im Vektor abläuft. Die letzte Phase des Zyklus ist eine weitere ungeschlechtliche Vermehrung, die als Schizogonie bezeichnet wird. Sie findet im Säuger statt und wird nochmals in zwei Phasen unterteilt: Eine präerythrozytäre Schizogonie, die in den Hepatozyten des Säugers durchlaufen wird und in eine erythrozytäre Schizogonie, die in den roten Blutkörperchen stattfindet und für die klinischen Symptome verantwortlich ist (Abb. 33).

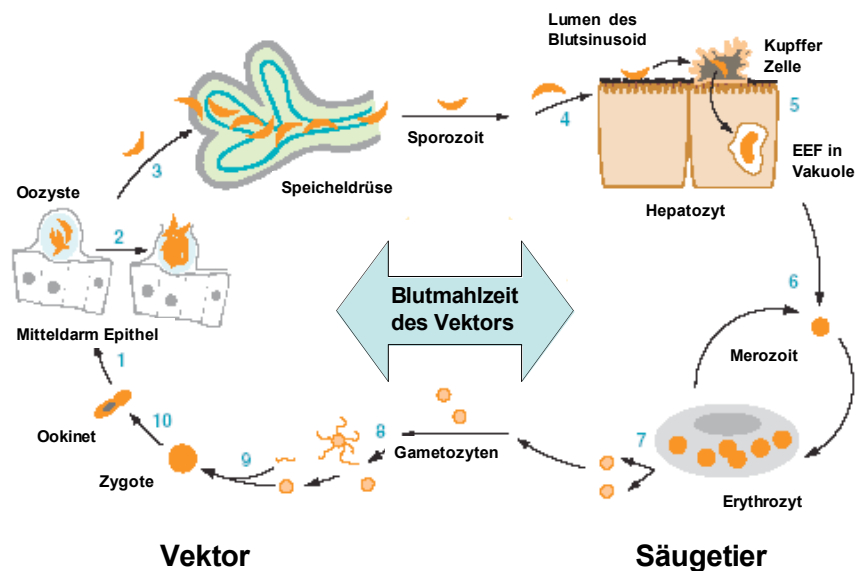


Abb. 33 Der Lebenszyklus von *Plasmodium*. Die bewegliche Zygote der Plasmodien wird Ookinete genannt (1). Sie entsteht nach der Vereinigung der beiden haploiden Gameten im Mitteldarm der weiblichen Moskito. Der Ookinete dringt durch das Darmepithel der Mücke und entwickelt sich zwischen Basallamina und Epithel zur Oozyste. (2) In ihrem Innern differenzieren sich Sporozoiten, die beim Platzen der reifen Oozyste in das Hemocoel frei gelassen werden. (3) Von dort gelangen sie über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen und bohren sich aktiv durch die Wände bis in die Drüsenkanäle, in denen sie sich sammeln. Beim nächsten Saugakt der Mücke gelangen die Sporozoiten in den Säuger. (4) Innerhalb weniger Minuten gelangen sie von der Einstichstelle über den Blutkreislauf in die Leber. Dort bewegen sie sich entlang des Sinusepithels der Leber, bis sie auf eine Kupferzelle treffen. (5) Durch diese dringen sie in das Leberparenchym ein und infizieren Hepatozyten (Pradel and Frevert, 2001). Während der Infektion bildet sich eine Vakuole, innerhalb derer die präerythrozytäre Schizogonie stattfindet. Dabei differenzieren sich die Sporozoiten innerhalb 48 bis 52 Stunden in exo-Erythrozytäre-Formen (EEF) um. (6) Die EEFs platzen auf und entlassen Merozoiten in die Blutbahn, die dann im Falle von *P. berghei* bevorzugt junge Retikulozyten befallen. Sie sind aber auch in reifen Erythrozyten zu finden (Deharo *et al.*, 1996). In diesen Zellen durchlaufen die Parasiten innerhalb einer parasitophoren Vakuole die erythrozytäre Schizogonie. Die erythrozytären Stadien bei *Plasmodium* durchlaufen vier Entwicklungsstadien: Ringform, Trophozoit, Schizont und Merozoit. Während dieser Phase baut der Parasit Hämoglobin zu Häm ab, welches zu Hämozoin biomineralisiert und als bräunlich schwarzes Malaria Pigment bekannt ist. Die ungeschlechtliche Vermehrung ist bei *P. berghei* relativ asynchron, sodass alle Stadien gleichzeitig im Blut zu finden sind. Im Schizontenstadium werden im Laufe der Cytokinese Merozoiten abgetrennt. (7) Manche Parasiten differenzieren sich im Blut zu Gametozyten. Diese Entwicklung dauert bei *P. falciparum* 8 bis 11 Tage, bei *P. berghei* ist sie schon nach 30 Stunden abgeschlossen. Die Gametozyten gelangen bei einem zweiten Saugakt der Mücke wieder in den Vektor. Nur dort können sie ihre Entwicklung fortsetzen. (8) Männliche Gametozyten

exflagellieren und lassen 4 bis 8 längliche, bewegliche Mikrogameten entstehen. Dies wird durch einen Temperaturabfall des Blutes um mindestens 5 °C, einen pH-Anstieg von 7,3 auf 8 und Xanthurensäure des Vektors ausgelöst (Billker *et al.*, 1997). Der Makrogamont entwickelt sich zu einem sphärischen Makrogameten. (9) Im Darm der Mücke verschmelzen Mikrogamet und Makrogamet zu einer Zygote, die sich zum Ookinet differenziert (10) (Kappe *et al.*, 2004; Mehlhorn and Piekarski, 2002). Abbildung verändert nach Kappe, Buscaglia und Nussenzweig, 2004.

6.2 Malaria und die klinische Symptomatik einer *Plasmodium* Infektion

Die Malaria beginnt mit uncharakteristischen Beschwerden wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Durchfall, Erbrechen, Müdigkeit, Schweißausbrüchen, Schüttelfrost und Schwindel. Für dieses Krankheitsbild sind die erythrozytären Entwicklungsstadien der Plasmodien verantwortlich und die Symptomatik beruht auf der Zerstörung von Erythrozyten sowie der Freisetzung von Parasiten und erythrozytärem Material. Das Fieber selbst gehört zum Selbstschutzmechanismus des Wirts und wird letztlich durch Toxine der Parasiten, wie z. B. das *merozoite surface antigen 1* (MSP-1), ausgelöst. Diese Antigene führen unter anderem zur Bildung der Cytokine Tumornekrosefaktor α und Interleukin I (IL-I) durch die Makrophagen. Sie sind fieber- und entzündungsfördernd und bewirken die Bereitstellung von zytotoxisch wirkenden O₂- bzw. NO- Intermediaten. Die Fieberanfälle treten je nach Art des Erregers nach unterschiedlichen Zeiten auf. Kommt es zu Mischinfektionen können die Fieberschübe unrythmisch auftreten, was die klinische Diagnose erschwert (Mehlhorn and Piekarski, 2002). In Endemiegebieten ist Malaria tropica und Malaria tertiana bei älteren Menschen milder und die Letalität geringer. Hierfür wird eine erworbene Teilresistenz verantwortlich gemacht, die als Semiimmunität bezeichnet wird. Sie ist zeitlich begrenzt und muss für jeden Plasmodienstamm eigens erworben werden (Wenk and Renz, 2003).

Bei der Malaria tertiana (*P. vivax*, *P. ovale*) erfolgt oft innerhalb weniger Tage eine Rhythmisierung der Fieberanfälle, die dann alle 48 Stunden auftreten. Typischerweise kommt es in den späten Nachmittagsstunden zum Schüttelfrost, in dessen Verlauf das Fieber sehr schnell auf Werte um 40 °C ansteigt. Nach einer drei- bis vierstündigen Fieberdauer fällt die Temperatur abrupt unter starken Schweißausbrüchen auf Normalwerte ab. Die Malaria tertiana verläuft nur selten tödlich. *P. vivax* und *P. ovale* können in der Leberphase, die der erythrozytären Phase vorausgeht, sog. Hypnozoiten bilden. Erst nach Jahren werden diese aktiviert und führen so zu neuen Malaria-Anfällen (Rezidive, engl. *relapse*). Etwa 40 % der Fälle geht auf *P. vivax* zurück, dem Erreger mit der größten geographischen Verbreitung. Weniger als 10 % der Krankheitsfälle können auf *P. ovale* und *P. malariae*, dem Erreger der Malaria quartana zurückgeführt werden.

Bei dieser Form der Malaria wechseln sich zwei fieberfreie Tage mit einem Fieber-Tag ab (72 Stunden Rhythmus). Auch für die Malaria quartana werden noch nach 30 Jahren Rückfälle beschrieben. Da *P. malariae* keine Hypnozoiten bildet, sind diese Anfälle einer kleinen Zahl von Parasiten in Erythrozyten zu zuschreiben, die dann eine neue Krankheitsphase etablieren können (Wenk and Renz, 2003).

Die für den Menschen gefährlichste Form der Malaria ist die Malaria tropica (*P. falciparum*). Sie ruft mehr als die Hälfte aller Malaria Erkrankungen hervor. Die Letalität der Malaria tropica beträgt

unbehandelt bis 20 %. Dabei können neben regelmäßigen Fieberschüben alle 48 Stunden auch ständige, unregelmäßige und durch hohes Fieber gekennzeichnete Krankheitsphasen (Continua) auftreten (Mehlhorn and Piekarski, 2002). Die Infektion mit *P. falciparum* kann außerdem zu einem Multiorganversagen führen. Bei der sog. zerebralen Malaria kann es zu Seh-, Koordinations- und Bewusstseinsstörungen bis hin zu Koma und Tod schon wenige Stunden nach Beginn der ersten Symptome führen (Lanzer *et al.*, 2000). Die mit der ersten Schwangerschaft assoziierte maternale Malaria kann zu einem vermindertem Geburtsgewicht, Früh- oder Totgeburten, Aborten sowie schwerer Anämie der Mutter und zum Tod der Mutter führen (Andrews and Lanzer, 2002; Menendez, 1995). Bei schwerer Malaria kann es außerdem zu Nierenversagen, Lungenödem, Gewebeschäden, Hämoglobinurie (Schwarzwasserfieber), Vergrößerung der Milz, Leberversagen und Acidose kommen (Sherman, 1998). Die molekulare Grundlage für diese komplizierte Form der Malaria ist die Zytoadhärenz infizierter Erythrozyten, die sich an Endothelzellen von Kapillaren und an uninfizierte Erythrozyten heften können. Letzteres wird als *rosetting* bezeichnet (Wahlgren *et al.*, 1992). Durch das Anheften entgeht der Parasit der Degradation veralteter Erythrozyten in der Milz. Aufgrund von Gefäßverschlüssen kann es zu Behinderungen der Blutzirkulation und zu Sauerstoffmangel in den verschiedenen Organen kommen (Berendt *et al.*, 1994; Cooke *et al.*, 1995), wobei die oben erwähnten schwerwiegenden Folgen auftreten können.

6.3 Das *P. berghei* CP α Gen

A

```
ATGGACAGCTTATTAATGAAAAGAAAAATTTATTAGACATGTATTATCAAATGCTCCACCAGGAAAAGTATT
CGATTTGATATCAAACCTAAAAACAATATTTGGATCAAATGCAATTATTCAGAATTTTATAGAAGATATTATATC
AAAATATAATGAAGATAATTATATTTTAAATCCCTTTGAAAGCGATGAATATATTATAATTTGTAAAGAATCTAAA
AGTGGAAATTTGTATCTTCACCCCAATTTAAAAATACTAGCCAATGTTAATCATTGTAAAAGGAAAGTAATTGAT
ACAACCCCTTGACCAAATGGATCACCCCGATATTTAGAAAAGTATAGAGTAGCATGTAATAACAAATTTAAA
AGAGTATGTCGATATTTATTACAAAAAATGGAGTGACCACCAAATGGGAATTACCCAACAGTTAACATAGGAT
CTAAGCATGGGTAAATGTAAAATGCGCTTCATCAGTTTATGCCTCTGAATGTGAAAATAAATATAATCTTTTTT
TACTCATATGTTGCGATAGATATTATTTGAAGAATTTTCATGCAAGTTCATGGCGGAGCTCATGGAATGTTAAC
TTTTTAGAAGCAGATCAAGAGATAATTTGACAGGTACTATTGATGTTGTTTTGACATATTTGAAGATGCAAAC
ATAAATTTAAGACACGGAAGTGTGAAAAAAGGGTTCCGTTACTAATGATATTGAGAATTTGCTTCAAG
CATTTTATCAGTCATACGCGAATGTGAAAATGATGTGCTTTATGATTTAAACATTTGATTGCCAATACAAGTA
GCGATTTAATTAAGAATACAAGAAAAATAATACCATTAAATGGTGATAAGTTTTATTGGATGGAGACATATCAG
GATATCCCAACTCAAATTAAGTTAGTATGA
```

B

```
ATGGACAGCTTATTAATGAAAAGAAAAATTTATTAGACATGTATTATCAAATGCTCCACCAGGAAAAGTATT
CGATTTGATATCAAGTTAGTTATTTTGAATGTGTGTGTAATATATATTTTTTTGAATATGTAATGAATGTCTG
CTAATAATATAAACATAATTGGTTAATACTATTCAAATAAATAAAAAGGATATAAATAAGCAAATTTTAAATTTTA
TTAGACCTAAAAACAATATTTGGATCAAATGCAATTATTCAGAATTTTATAGAAGATATTATATCAAAAATATAAT
GAAGATAATTATATTTTAAATCCCTTTGAAAGCGATGAATATGTAACTTTATAATTTAAATATGTGGAAATAAAT
ATGTATATTCACACCTATATAATTTACGCTCTACAACATCATTAAATAAGTTGTAAGGTGTATATAAAATGTGC
ATATATAATTTTTTTTTTAAATTTTACAGATTATAATTTGTAAGAATCTAAAAGTGGAAATTTGTATCTTCACCCCA
ATTTAAAAATACTAGCCAATGTTAATCATTGTAAAAGGGTATAAATACACGAAAAATGTTAATAAAATACATGTA
TAAGTTTGTATTGATAATAATATATTTTTATATAACATTTGGGAATTTTAGAAAAGTAATTGATACAACCCCC
TTGACCAAATTTGGATCACCCCGATATTTAGAAAAGTATAGGTAACATGTATACGCATTAATAAAATTTTCGAT
GATATTTTTTTTTTAAATTTTATACTTTGATTATGTTTCTATACTTAAATACGTTTTCTTTATTTGAATAAAAAACAA
GAGTAGCATGTAATAACAAATTAAGAGTATGTCGATATTTATTACAAAAAATGGAGTGACCACCAAATGGG
AATTACCCAACAGTTAACATAGGATCTAAGCATGGGTTAAATGTAAAATGCGCTTCATCAGTTTATGCTCTGA
ATGTGAAAATAAATATAATCTTTTTTACTCATATGTTGCGATAGATATTATTTGAAGAATTTTCAGTAAGAATAA
AAAAATGTTTGAATATATTGCGTGAATATAACAGGGTTATATATATTTTTAACTATATTCAATAATAAAAT
```

ATTATAATTTCTCGAGAGTATTTTGATTAACAGCTTTTTTAATAAAATATAATTTTTTTGATGAAATGTTTCAGTG
CAAGTTCATGGCGGAGCTCATGGAATGTTAACTTTTTAGAAAGCAGATCAAGAGATAATTTTGACAGTAAAAATT
AGCATGCCTATATGTGAATTAATATATAAGCACACATACACATACATATATATATTTTTTTTCATTAATGC
TCAAAGGGTACTATTGATGTTGTTTTGACATATTTTGAAGATGCAAACATAAAATTTTAAGACACGGAAAGTGTTT
GAAAAAAGGGTTTCCGTTACTAATGTATAGAGAACAATTATTATAAGACAAAAAAGGACTATCATTTTTTACTT
GTATAATTTTATATGTTTTTTAAATTGTGGATTTCCCATATTGTGATTTTTTTTTTTGGTCAGGATATTGAGAATT
TCGCTTCAAGCATTTTATCAGTCATACGCGAATGTGAAAATGATGTGCTTTATGATTTAAACCATTTGATTGCC
AATACAAGTCCTTATTAATAAAATTTAAATAAATTTATTAAGGAAACAATATTGTTAATAATTTTCGATATGAATATG
TGGCATCACTTTGTTTAAAGAAAATATTATTCTATGATATGATGTACTTTATTTAATTTATTCAGGTAGCGATT
AATTAAGAATACAAGAAAAATAATACCATTAATGGTGATAAGTTTTATTGGATGGAGACATATCAGGATATCC
CAACTCAAATTAAGTTAGTATGA

Abb. 34 Kodierende und genomische DNA Sequenz von *PbCP* α . In **A** ist die kodierende Sequenz gezeigt, in **B** ist die genomische Sequenz gezeigt. Start- und Stopp-Kodon sind jeweils fett gedruckt; die kodierenden Abschnitte sind jeweils grau unterlegt.

6.4 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , engl. für Rinderserum Albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>copied DNA</i> , engl. für komplementäre DNA
CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
ddH ₂ O	zweimal destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> engl. für Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxyribonucleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , engl. für fötales Kälberserum
for	<i>forward</i> , in Leserichtung des Gens
G	Guanin
g	Gramm / Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hc	Hemocoel
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethylsulfonsäure)
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-1 thio- β -D-galactopyranosid
i.v.	intravenös
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter

LB-Medium	Luria-Broth-Medium
μ	Mikro-, 10^{-6}
m	Meter, Milli- (10^{-3})
M	Molar
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
n	Nano-
NaAc	Natriumacetat
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
p	Piko- (10^{-9}) / Plasmid
pABA	para-Aminobenzoessäure
<i>P. berghei</i> , <i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. falciparum</i> , <i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , engl. für Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , pH-Wert
rev	<i>revers</i> , gegen die Leserichtung des Gens
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , engl. für Ribonucleinsäure
RNase A	Ribonuclease A
rpm	<i>revolutions per minute</i> , engl. für Umdrehungen pro Minute
RPMI-Medium	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i> -Medium
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SD	Sprague Dawley-Ratten
Sp	Speicheldrüsen-assoziierte Sporoziten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
U	<i>unit</i> , biochemische Einheit für die Enzymaktivität
V	Volt
v / v	Volumenprozent
w / v	Gewichtsvolumenprozent

6.5 Manuskript und Publikation

Das eingangs erwähnte Manuskript zur Rolle des *Plasmodium capping* Proteins sowie die Publikation zur Struktur und Funktion von *Plasmodium* Profilin sind dem Appendix in folgender Reihenfolge beigelegt:

I

Ganter M., Schüler H., and Matuschewski K.

Vital role for the *Plasmodium* actin capping protein (CP) beta-subunit in motility of the malaria transmission stage.

(zur Publikation eingereicht)

II

Kursula I., Kursula P., Ganter M., Panjekar S., Matuschewski K., and Schuler H. (2008) Structural Basis for Parasite-Specific Functions of the Divergent Profilin of *Plasmodium falciparum*.

Structure **16**: 1638-1648

I

**Vital role for the *Plasmodium* actin capping protein
(CP) beta-subunit in motility of the malaria
transmission stage**

(zur Publikation eingereicht)

Vital role for the *Plasmodium* actin capping protein (CP) beta-subunit in motility of the malaria transmission stage

Markus Ganter^{*,†}, Herwig Schüler^{*,‡}, and Kai Matuschewski^{*,†}

* Department of Parasitology, Heidelberg University School of Medicine, 69120 Heidelberg, Germany.

† Parasitology Unit, Max Planck Institute for Infection Biology, 10117 Berlin, Germany

‡ Structural Genomics Consortium, MBB, Karolinska Institute, 17177 Stockholm, Sweden

Address correspondence to: Kai Matuschewski (matuschewski@mpiib-berlin.mpg.de)

Running Head: *Plasmodium* actin capping protein

Abstract: 180 words

Key words: *Plasmodium*, malaria, sporozoite, actin, capping protein, CapZ, Apicomplexa.

Abbreviations: Arp1, actin related protein-1; CapZ, capping protein in Z-disks; CP, capping protein; CSP, circumsporozoite protein; TRAP, thrombospondin-related anonymous protein; *UIS*, gene upregulated in infectious sporozoites.

Abstract

Successful malaria transmission from the mosquito vector to the mammalian host depends crucially on active sporozoite motility. Sporozoite locomotion and host cell invasion are driven by the parasite's own actin/myosin motor. A unique feature of this motor machinery is the presence of very short subpellicular actin filaments. Therefore, F-actin stabilizing proteins likely play a central role in parasite locomotion. Here, we investigated the role of the *P. berghei* actin capping protein (*PbCP*), an ortholog of the heterodimeric regulator of filament barbed end growth, by reverse genetics. Parasites containing a deletion of the CP beta-subunit developed normally during the pathogenic erythrocytic cycle. Due to reduced ookinete motility, mutant parasites form fewer oocysts and sporozoites in the *Anopheles* vector. These sporozoites display a vital deficiency in forward gliding motility and fail to colonize the mosquito salivary glands resulting in complete attenuation of life cycle progression. Together, our results show that the CP beta subunit exerts a dual role in the insect vector before malaria transmission to the mammalian host. The vital role is restricted to fast locomotion, as displayed by *Plasmodium* sporozoites.

Introduction

The actin-based microfilament system drives motile processes, such as cell motility, cytokinesis and vesicle transport in eukaryotic cells. These processes require dynamic interconversion of pools of monomeric and filamentous actin (G- and F-actin, respectively), regulated by a large number of accessory proteins (Carlier and Pantaloni, 2007). Capping protein (CP) is a heterodimeric protein that controls assembly at the barbed (fast growing) end of the actin filament in non-muscle cells (Wear and Cooper, 2004; Cooper and Sept, 2008). Its skeletal muscle variant, CapZ, links barbed ends of filaments to the Z-line. CP is a central component of actin polymerization-driven cell motility, as it restricts growth of a subset of filaments thereby allowing fast, directed polymerization

from a pool of unpolymerized actin. It is enriched in the periphery of motile cells, where filament growth pushes the cell envelope forward (Amatruda and Cooper, 1992). CP is necessary for *in vitro* reconstituted actin-based motility (Loisel *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae*, CP null mutants are viable but display disorganized actin patches (Amatruda and Cooper, 1992). These loss-of-function mutants are synthetic lethal with null mutants of the filament crosslinking protein fimbrin (Adams *et al.*, 1993). CP is also a component of the dynactin complex, where it binds to the barbed end of the actin-related protein 1 (Arp1) minifilament (Schafer *et al.*, 1994). CP gene inactivation in *Dictyostelium*, *Drosophila*, and mouse, resulted in increased length and bundling of actin filaments, excessive ruffling, and loss of lamellipodia and explosive formation of filopodia, respectively (Hug *et al.*, 1995; Rogers *et al.*, 2003; Mejillano *et al.*, 2004). These reverse genetic approaches demonstrated a direct role of CP in actin-based motility. However, no vital *in vivo* function has been described for CP so far.

In this study, we characterized the cellular role of CP β in the unicellular eukaryote *Plasmodium*, the causative agent of malaria. Malaria remains the most important vector-borne infectious disease and particularly affects children in sub-Saharan Africa (Guinovart *et al.*, 2006). During the complex life cycle in the mosquito vector and vertebrate host the parasite follows a developmental program with alternating intracellular transformation and replication phases that lead to the formation of invasive stages. These stages, i.e. merozoites, ookinetes, and sporozoites, are highly specialized for recognition of and entry into host cells, namely erythrocytes, the mosquito midgut epithelium, and mammalian hepatocytes, respectively. All malaria-associated symptoms and pathology originate exclusively from the pathogenic asexual red blood cell phase of the parasite life cycle. *Plasmodium* invasion differs fundamentally from receptor-mediated endocytosis, a hallmark of bacterial and viral host cell entry mechanisms (Sibley, 2004). Malaria and related parasites, such as *Toxoplasma gondii*,

employ their own actin/myosin motor machinery to propel themselves into the host cell (Sibley, 2004; Keeley and Soldati, 2004). In addition, actin-based motility drives parasite locomotion and transmigration *en route* to the final target cell. Understanding the underlying molecular mechanisms has important implications for future malaria intervention strategies in order to target multiple stages and species simultaneously.

The actin motor machinery of the parasite features the short tailless motor MyoA (Meissner *et al.*, 2002), tethered to the inner membrane complex by accessory proteins (Bergman *et al.*, 2003), and very short polymers of actin that are linked to TRAP/MIC2-family invasins via aldolase (Jewett and Sibley, 2003; Buscaglia *et al.*, 2003) and possibly other proteins. This arrangement mediates gliding on the substratum, apparently by moving F-actin-receptor complexes from the apical tip backwards along the parasite's longitudinal axis (Sibley, 2004; Schüler and Matuschewski, 2006a). The regulation of this motor machinery remains elusive. *Plasmodium* and related Apicomplexa encode only a fraction of the conventional microfilament regulators, with many protein families missing entirely (Schüler and Matuschewski, 2006b; Baum *et al.*, 2006). Given the intrinsic instability of parasite actin polymers (Schmitz *et al.*, 2005; Schüler *et al.*, 2005; Sahoo *et al.*, 2005) F-actin end-capping proteins are expected to be required both for orchestrated F-actin assembly and sustained filament stability. In *Plasmodium* genomes, two formin homology domains and two capping protein subunits can be identified, while WASP homology domains, an Arp2/3 complex, and gelsolin-related proteins are apparently absent (Schüler and Matuschewski, 2006b; Gordon and Sibley, 2005).

Plasmodium and other apicomplexan parasites contain single copies of both CP subunits in their genomes. We previously identified *CPβ* in a screen for transcripts that are upregulated during maturation of sporozoite infectivity, indicating that *CPβ/UIS17* (upregulated in infectious sporozoites gene 17) plays a particularly important role during malaria transmission

from the mosquito to the mammalian host (Matuschewski *et al.*, 2002). Notably, infectious sporozoites are the only *Plasmodium* stages that display fast (1-3 mm/sec) gliding motility (Matuschewski and Schüler, 2008). In this study, we could identify an essential function for *CPβ* in sporozoite gliding locomotion and, as a consequence, colonization of *Anopheles* salivary glands. Our data suggest that F-actin capping by CP is vital only for fast locomotion, a property of *Plasmodium* sporozoites that ensures efficient transmission to the vertebrate host.

Results

Plasmodium capping protein

Protein sequences of the putative beta capping protein subunits from different *Plasmodium* species (PFE0880c and PB000641.00.0 for *P. falciparum* and *P. berghei* *CPβ*, respectively) share around 25% sequence identity with those of yeast, chicken, and human (Suppl. Fig. 1A). Despite this low overall sequence conservation, the majority of the key residues stabilizing the heterodimer (Yamashita *et al.*, 2003) and those implicated in actin binding (Yamashita *et al.*, 2003; Barron-Casella *et al.*, 1995; Narita *et al.*, 2006) are present (Suppl. Fig. 1B). In addition, the *Plasmodium* genomes encode the corresponding alpha subunit (*CPα*; data not shown).

Superposition of a *Plasmodium berghei* *CPα/β* homology model and the chicken CapZ crystal structure (Fig. 1A) indicates that the parasite capping protein may adopt a similar fold. However, the structural examination points to an important unique trait of parasite *CPβ*. Its C-terminal "tentacle", implicated by homology in actin binding (Wear and Cooper, 2004), is about twice as long as that of chicken CapZβ (Suppl. Fig. 1B), but has a very similar amphipathic character (Fig. 1B). While this difference likely represents an adaptation to the structure of the parasite actin filament, the overall structural model is consistent with the heterodimeric *Plasmodium* capping protein functioning in actin polymer regulation.

In order to study the cellular role of *Plasmodium* CP for parasite propagation we first tested transcript expression of both

subunits in the three extracellular and invasive parasite stages, namely blood stage merozoites, ookinetes, and sporozoites that enter host erythrocytes, the mosquito midgut epithelium, and host hepatocytes, respectively (Fig. 2). As expected, the two genes are expressed in all motile stages similar to the motor protein MyoA. This expression pattern suggested important functions of *Plasmodium CP* in multiple extracellular life cycle stages.

Generation of *CPβ(-)* parasites

We focussed on the *in vivo* roles of *CPβ/UIS17* for parasite development in the two hosts. Reverse genetics in the rodent malaria model parasite *P. berghei* is particularly suited to study gene functions during *Plasmodium* life cycle progression. In a first attempt we targeted the endogenous *PbCPβ* locus with an integration vector that disrupts the corresponding open reading frame. Successful stable insertion of the integration plasmid suggested that *CPβ* is dispensable for propagation of the pathogenic blood stages (data not shown).

To confirm this unexpected finding and to generate a genetically stable *CPβ* loss-of-function parasite line, we constructed a targeting vector that contained the 5' and 3' *CPβ* flanking regions separated by the mutant *T. gondii dhfr/ts* gene cassette as a positive selection marker (Fig. 3A). Upon transfection the target gene locus is replaced with the selection marker via a double homologous recombination event. We obtained a parental population that contained mixed parasites with the disrupted *cpβ(-)* and the wild-type *CPβ* locus (not shown). Next, we cloned parasite lines *in vivo* by serial dilution and intravenous injection into 15 NMRI mice as recipient animals. We obtained six clones: three WT, one mixed and two *cpβ(-)* lines. Genotyping of the *cpβ(-)* clones by replacement-specific PCR analysis confirmed the absence of the WT-specific signal, and successful disruption of the *CPβ* locus (Fig. 3B). RT-PCR analysis with poly (A)⁺ RNA from wild-type and mutant mixed blood stages confirmed the absence of *CPβ* transcripts in the *cpβ(-)* parasite lines (Fig. 3C). Successful generation of *CPβ* loss-of-function parasite

lines thus confirmed that this gene is not vital for propagation of the pathogenic asexual blood stages.

To test whether mutant parasites display a growth defect during blood stage multiplication we performed an *in vivo* growth assay by intravenous injection of 1,000 parasite blood stages into mice, followed by daily parasitemia counts (Fig. 3D). Proliferation of *cpβ(-)* parasites was indistinguishable from wild-type parasites suggesting that *CPβ* is not essential in the pathogenic blood stages.

cpβ(-) parasites are impaired in ookinete invasion of the mosquito midgut

We then tested the mutant parasites for transmission to the *Anopheles* vector. A fraction of asexual blood stages eventually enter sexual development giving rise to female and male gametes that fuse in the mosquito midgut to form a motile zygote, the ookinete (Kooij and Matuschewski, 2007). Quantification of sexual stages in Giemsa-stained blood smears of infected mice showed that *cpβ(-)* parasites are not affected in commitment to form mature gametes (Suppl. Tab.1). Similarly, we could not observe a loss-of-function phenotype in *in vitro* formation of ookinetes, the stage that penetrates the mosquito midgut epithelium (Suppl. Tab.1). Together, these findings suggest that transmission from the warm-blooded host to the invertebrate vector does not rely on functional *CPβ*.

When we counted oocyst numbers of wild-type and mutant parasites at day 10 after mosquito infection we could detect a significant phenotype that was, however, not complete (Fig. 4 and Suppl. Fig. 2). The *cpβ(-)* parasites produce substantially fewer oocysts as compared to the isogenic WT. This finding was corroborated by membrane feeding of *in vitro* cultured ookinetes to *Anopheles* mosquitoes (Fig. 4), suggesting that the observed reduced ookinete infectivity does not depend on the presence of the peritrophic membrane that is formed after blood meal ingestion. Most importantly, mutant ookinetes that successfully penetrated the midgut epithelium are capable of producing mature midgut-associated oocysts (Fig. 4). This

observation prompted us to test the ability of ookinetes to glide *in vitro* (Fig. 5 and Suppl. Movies 1-2). In good agreement with the impaired oocyst production rate we observed a reduction in ookinete motility. Quantitative analysis of ookinete velocities revealed an average speed of 3.5 (± 0.9) $\mu\text{m}/\text{min}$ and 6.9 (± 2.1) $\mu\text{m}/\text{min}$ for *cp β (-)* and WT ookinetes, respectively (Fig. 5B). Nevertheless, mutant ookinetes transiently displayed fast locomotion (Fig. 5C). Together, *cp β (-)* ookinetes displayed productive motility and were apparently capable of reaching the midgut epithelium (Fig. 4). From these findings we conclude that *CP β* plays an auxiliary role in ookinete penetration of the mosquito midgut epithelium.

***CP β (-)* sporozoites are non-motile and fail to invade salivary glands**

To confirm the capacity of *cp β (-)* parasites to form sporozoites we counted midgut-associated sporozoites at various time points after infection (Table 1). As expected, mutant parasites were able to produce substantial numbers of midgut sporozoites. In fact, the average number of midgut sporozoites was only moderately diminished as compared to the observed reduction in oocyst numbers (Fig. 4), consistent with a recent observation that *Plasmodium* development in the mosquito vector exhibits a strong density dependence, i.e. few oocysts produce disproportionately high numbers of sporozoites (Sinden *et al.*, 2007).

When we followed sporozoite maturation we observed a dramatic loss-of-function phenotype (Table 1); *cp β (-)* sporozoites lost their ability to invade salivary glands, the final target organ in the mosquito vector. Consistent with this finding, none of highly susceptible C57bl/6 mice or young Sprague/Dawley rats developed a malaria infection when *cp β (-)*-infected *Anopheles* mosquitoes were used to infect naïve animals by natural mosquito bites (Table 2). This finding indicated an essential role of *CP β* during sporozoite maturation, a prerequisite to complete the life cycle and infect the mammalian host (Matuschewski, 2006).

To test whether ablation of salivary gland invasion was the exclusive cause for the observed interruption of transmission we

isolated large numbers of midgut-associated sporozoites and injected them intravenously into susceptible mice (Table 2). Again, all infected mice stayed free of malaria. This observation prompted us to study sporozoite gliding locomotion. For this analysis, we isolated hemocoel sporozoites, the stage that is the most advanced in the mutant parasite lines. In marked contrast to WT sporozoites that perform continuous fast gliding (Fig. 6 and Suppl. Movie 3), *cp β (-)* sporozoites never displayed productive locomotion (Fig. 6 and Suppl. Movie 4). Notably, bending and flexing, a microtubule-dependent form of non-productive motility (Vanderberg, 1975), was frequently observed, corroborating the viability of mutant sporozoites and supporting a distinct defect in forward locomotion. In good agreement with defective sporozoite locomotion, we detected substantial numbers of midgut-associated sporozoites throughout the mosquito life span (Table 1), suggesting that active gliding motility is important for efficient sporozoite egress out of oocysts.

In conclusion, the *Plasmodium CP β* subunit exerts a vital function during life cycle progression of the malaria parasite in the insect vector. Loss of *CP β* function results in non-motile sporozoites that fail to colonize the mosquito salivary glands and, hence, cannot be transmitted to the vertebrate host.

Discussion

The most important finding of our reverse genetics analysis of *Plasmodium CP β* is a vital role for life cycle progression of the unicellular obligate intracellular malaria parasite. Our systematic phenotypic characterization of *P. berghei cp β (-)* parasites revealed important cellular functions exclusively in locomotion of extracellular parasite stages. We establish that *CP β* is essential for sporozoite gliding locomotion, a function that is gradually acquired during sporozoite maturation and required for subsequent transmission to the mammalian host (Matuschewski, 2006). This stage-specific vital role of *CP β* correlates with fast motility, a feature observed only in mature, salivary gland-associated sporozoites. In analogy, we predict that the *Toxoplasma gondii CP β* protein performs essential functions for

motility of tachyzoites, the fast-replicating stage that infects all nucleated cells.

Unexpectedly, *CPβ* is dispensable for asexual erythrocytic parasite growth, the life cycle phase that causes all malaria-related morbidity and mortality. Proliferation of *cpβ(-)* parasites were indistinguishable from WT parasites. Two actin-dependent processes appear to be central to the intra-erythrocytic cycle, i.e. endocytic hemoglobin uptake (Smythe *et al.*, 2008) and erythrocyte invasion (Miller *et al.*, 1979). Since a defect in hemoglobin uptake, the major amino acid source for the parasite, likely translates into delayed and/or decreased merozoite formation, we postulate that an actin capping activity, if any, is either redundant or mediated by proteins other than CP. Inhibitor studies established a requirement for parasite actin in merozoite invasion (Miller *et al.*, 1979). In support of a non-vital role of *CPβ* in actin capping during this process *PbCPβ* transcripts are readily detectable in free merozoites. In a previous biochemical study three major F-actin binding proteins, i.e. HSP70 and two unknown proteins of 32 and 34 kDa, were isolated from *P.knowlesi* merozoites (Tardieux *et al.*, 1998). The F-actin binding properties and the respective molecular sizes of the yet unidentified proteins are consistent with the heterodimeric CP protein. In addition, the formin-like protein1 has been localized in the vicinity of the parasite restriction that forms upon cell entry, termed moving junction (Baum *et al.*, 2008). Formin-dependent incorporation of G-actin monomers into the growing filament resembles a transient barbed end capping function that may partially compensate for the lack of *CPβ*. However, it is important to note that a reduced speed of merozoite invasion into erythrocyte, which is typically completed within 30 seconds, does not necessarily translate into a detectable alteration of parasite propagation. The intra-erythrocytic life cycle phase of *P.berghei* takes 24 hours. Therefore, *cpβ(-)* may either have a partial invasion defect that remains undetected *in vivo* or *CPβ* is dispensable for the motility of merozoites, which appear to lack the capacity to glide on substrates entirely.

Direct proof for a role of *CPβ* in cell

motility comes from the intermediate phenotype observed in *cpβ(-)* ookinetes that display an overall reduced motility, while all other functions, including zygote formation and viability as well as subsequent sporogony, remain unaffected. Membrane feedings of *in vitro* cultured ookinetes excluded a defect in penetration of the peritrophic membrane, which is formed exclusively after a blood meal and requires secretory parasite proteins, such as chitinase, to be permissive for ookinetes.

The observed intrinsic instability of *Plasmodium* actin (Schmitz *et al.*, 2005, Schuler *et al.*, 2005) is expected to result in rapid microfilament depolymerization. Therefore, the cellular role of CP as an F-actin stabilizer may be particularly important in this model eukaryote. Barbed end capping by CP is essential for fast actin/myosin-dependent gliding locomotion, as displayed by mature infectious *Plasmodium* sporozoites. Incidentally, this forward motility displaying an average speed of 1-3 $\mu\text{m}/\text{sec}$. is amongst the fastest gliding locomotions on substrates for any eukaryotic cell (Vanderberg, 1975). We propose that barbed end capping by capping protein is vital for rapid microfilament turnover to achieve high speed actin-dependent locomotion *in vivo*.

Material and Methods

Experimental animals

Animals were from Charles River Laboratories. All animal work was conducted in accordance with European regulations and approved by the state authorities (Regierungspräsidium Karlsruhe).

Parasite transfection and genotypic analysis

For replacement of *PbCPβ* we employed primers *PbCPβ_forI* (5'-ATCCCCGCGGAGTACATGCAATATATACATATATATTCAATGC-3'; *SacII* site is underlined) and *PbCPβ_revII* (5'-ATAAGAATGCGGCCGCAATTTAGTTTTTTATATGGTTATTTATTATTACAG-3'; *NotI* site is underlined) for amplification of the 5' flanking region, and *PbCPβ_revIII* (5'-CCCCAAGCTTGAATGCGATTTTAGGGGC CAATACAATTAGC-3'; *HindIII* site is underlined) and *PbCPβ_revIV* (5'-

CGGGGTACCCGATTTTTTTTATTAATTC
ATCAAATTTTCCC-3'; *KpnI* site is underlined) for the 3' flanking region, respectively, using *P. berghei* genomic DNA as template. Cloning into the *P. berghei* transfection vector (Thathy and Ménard, 2002) resulted in the plasmid pPbCP β rep. The targeting plasmid was linearized with *SacII* and *KpnI*, and parasite transfection, positive selection, and parasite cloning were performed as described previously (Janse *et al.*, 2006). We obtained two independent *cp β* (-) clonal parasite populations that were phenotypically identical. Detailed analysis was performed with one representative clone.

Transcript detection

For RT-PCR analysis, we isolated poly (A⁺) RNA using oligo dT-columns (Invitrogen). For cDNA synthesis and amplification, we performed a two-step PCR using oligo dT primers (Ambion) and subsequent standard PCR reactions, using gene-specific primers.

Analysis of parasite development

Anopheles stephensi mosquito rearing and maintenance was carried out under a 14 h light/10 h dark cycle, 75% humidity and at 28 °C or 20 °C, respectively. Blood-stage development was analyzed *in vivo* in asynchronous infections using Naval Medical Research Institute (NMRI) mice. Gametocyte differentiation and exflagellation of microgametes were detected in mice before ookinete culture or mosquito feedings, respectively.

Ookinete culture was conducted in RPMI 1640 medium with L-glutamine and 25mM HEPES (Gibco) supplemented with 100mM sodium bicarbonate; 100 μ M hypoxanthine; 10% FCS; 50 μ M xanthurenic acid and 125 U/ml penicillin/streptomycin. For ookinete culture, we treated Theiler's Original (TO) mice with phenylhydrazine (1,2mg/mouse) 24h before infection. Infected blood was collected by cardiac puncture 4 days after infection and added to 10 volumes of culture medium. After incubation for 24 hours at 20°C, erythrocytes were lysed for 20min in ice-cold ammonium chloride solution (170mM), ookinetes were washed and

resuspended in HBSS. For artificial membrane feeding of ookinetes, cultured ookinetes were mixed with 1 ml blood from a naïve mouse and applied to a temperature-regulated glass feeder.

Ookinete motility was analyzed by time laps microscopy. Cultured ookinetes were purified, mixed with mos20 cells and imaged on a Zeiss Axiovert M200 microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Images were captured using a CoolSnap HQ camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) and MetaMorph imaging software (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). Processing of all images was conducted utilizing the program ImageJ.

Sporozoites were dissected and analyzed as described previously (Vanderberg, 1975). For determination of sporozoite infectivity, infected mosquitos were dissected at days 14–30 after feeding. Sporozoites were liberated and injected intravenously at the numbers indicated into young Sprague/Dawley rats or C57bl/6 mice, respectively. Patency was determined by daily examination of Giemsa-stained blood smears.

Homology modelling

The homology model of the *P. berghei* CP α / β heterodimer was constructed based on sequence alignments with the respective chicken CapZ subunit sequences using SWISS-MODEL (Guex and Peitsch, 1997). The α -subunits are 23.8 % identical and 42.3 % similar, and the β -subunits are 30.7 % identical and 37.2 % similar on the amino acid level. The model was superimposed onto the crystal structure of the chicken CapZ heterodimer (PDB entry 1izn). The β - subunit tailpieces shown in Fig. 1b represent the sequences 250-PDNQKYKQLQRELSQVLTQRQI-271 (*GgCP β*) from crystal structure 1izn and KSKGNIQNELKSKLKKK (*PbCP β*) from the homology model based on that structure.

Acknowledgements

We thank Silvia Münter for assistance with fluorescence microscopy. Our work was supported by a grant from the Deutsche

Forschungsgemeinschaft (Schwerpunktprogramm 1150), and in part by the European Commission (BioMalPar, #23), the Joachim Siebeneicher Foundation and the Chica and Heinz Schaller Foundation.

References

- Adams, A.E.M., Cooper, J.A., and Drubin, D.G. (1993). Unexpected combinations of null mutations in genes encoding the actin cytoskeleton are lethal in yeast. *Mol. Biol. Cell* *4*, 459-468.
- Amatruda, J.F., and Cooper, J.A. (1992). Purification, characterization and immunofluorescence localization of *Saccharomyces cerevisiae* capping protein. *J. Cell Biol.* *117*, 1067-1076.
- Barron-Casella, E.A., Torres, M.A., Scherer, S.W., Heng, H.H.Q., Tsui, L.-C., and Casella, J.F. (1995). Sequence analysis and chromosomal localization of human CapZ. Conserved residues within the actin-binding domain may link CapZ to gelsolin/severin and profilin protein families. *J Biol Chem* *270*, 21472-21479.
- Baum, J., Papenfuss, A.T., Baum, B., Speed, T.P., and Cowman, A.F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 621-628.
- Baum, J., Tonkin, C.J., Paul, A.S., Rug, M., Smith, B.J., Gould, S.B., Richard, D., Pollard, T.D., and Cowman, A.F. (2008). A malaria parasite formin regulates actin polymerization and localizes to the parasite-erythrocyte moving junction during invasion. *Cell Host Microbe* *3*, 188-198.
- Bergman, L.W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T.M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenzweig, V., and Kappe, S.H. (2003). Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *J. Cell Sci.* *116*, 39-49.
- Buscaglia, C.A., Coppens, I., Hol, W.G., and Nussenzweig, V. (2003). Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium*. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4947-4957.
- Carrier, M.F., and Pantaloni, D. (2007). Control of actin assembly dynamics in cell motility. *J. Biol. Chem.* *282*, 23005-23009.
- Cooper, J.A., and Sept, D. (2008). New insights into mechanism and regulation of actin capping protein. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* *267*, 183-206.
- Gordon, J., and Sibley, L.D. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics* *6*, 179.
- Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* *18*, 2714-2723.
- Guinovart, C., Navia, M.M., Tanner, M., and Alonso, P.L. (2006). Malaria: burden of disease. *Curr. Mol. Med.* *6*, 137-140.
- Hug, C., Jay, P.Y., Reddy, I., McNally, J.G., Bridgman, P.C., Elson, E.L., and Cooper, J.A. (1995). Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in *Dictyostelium*. *Cell* *81*, 591-600.
- Janse, C.J., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., and Waters, A.P. (2006). High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol. Biochem. Parasitol.* *145*, 60-70.
- Jewett, T.J., and Sibley, L.D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Mol. Cell* *11*, 885-894.
- Keeley, A., and Soldati, D. (2004). The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by *Apicomplexa*. *Trends Cell Biol.* *14*, 528-532.
- Kooij, T.W.A., and Matuschewski, K. (2007). Triggers and tricks of *Plasmodium* sexual development. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 547-553.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carrier, M.F. (1999). Reconstruction of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* *401*, 613-616.

- Matuschewski, K., Ross, J., Brown, S., Kaiser, K., Nussenzweig, V., and Kappe, S.H. (2002). Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage. *J. Biol. Chem.* *277*, 41948-41953.
- Matuschewski, K. (2006). Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector. *Cell. Microbiol.* *8*, 1547-1556.
- Matuschewski, K., and Schüler, H. (2008). Actin/myosin-based motility in apicomplexan parasites. *Subcell. Biochem.* *47*, 110-120.
- Meissner, M., Schlüter, D., and Soldati, D. (2002). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* *298*, 837-840.
- Mejillano, M.R., Kojima, S.I., Applewhite, D.A., Gertler, F.B., Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (2004). Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* *118*, 363-373.
- Miller, L.H., Aikawa, M., Johnson, J.G., and Shiroshi, T. (1979). Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J. Exp. Med.* *149*, 172-184.
- Narita, A., Shuishi, T., Yamashita, A., and Maeda, Y. (2006). Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study. *EMBO J.* *25*, 5626-5633.
- Rogers, S.L., Widemann, U., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2003). Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J. Cell Biol.* *162*, 1079-1088.
- Sahoo, N., Beatty, W., Heuser, J., Sept, D., and Sibley, L.D. (2005). Unusual kinetic and structural properties control rapid assembly and turnover of actin in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell* *17*, 895-906.
- Schafer, D.A., Gill, S.R., Cooper, J.A., Heuser, J.E., and Schroer, T.A. (1994). Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *J. Cell Biol.* *126*, 403-412.
- Schmitz, S., Grainger, M., Howell, S., Calder, L.J., Gaeb, M., Pinder, J.C., Holder, A.A., and Veigel, C. (2005). Malaria parasite actin filaments are very short. *J. Mol. Biol.* *349*, 113-125.
- Schüler, H., Mueller, A.K., and Matuschewski, K. (2005). Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS Lett.* *579*, 655-660.
- Schüler, H., and Matuschewski, K. (2006a). *Plasmodium* motility: actin not actin' like actin. *Trends Parasitol.* *22*, 146-147.
- Schüler, H., and Matuschewski, K. (2006b). Regulation of apicomplexan microfilament dynamics by a minimal set of actin-binding proteins. *Traffic* *7*, 1433-1439.
- Sibley, L.D. (2004). Intracellular parasite invasion strategies. *Science* *304*, 248-253.
- Sinden, R.E., *et al.* (2007). Progression of *Plasmodium berghei* through *Anopheles stephensi* is density-dependent. *PLoS Pathog.* *3*, e195.
- Smythe, W.A., Joiner, K.A., and Hoppe, H.C. (2008) Actin is required for endocytic trafficking in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell. Microbiol.* *10*, 452-464.
- Tardieux, I., Baines, I., Mossakowska, M., and Ward, G.E. (1998). Actin-binding proteins of invasive malaria parasites and the regulation of actin polymerization by a complex of 32/34-kDa proteins associated with heat shock protein 70kDa. *Mol. Biochem. Parasitol.* *93*, 295-308.
- Thathy, V., and Ménard, R. (2002). Gene targeting in *Plasmodium berghei*. *Methods Mol. Med.* *72*, 317-331.
- Vanderberg, J.P. (1975). Development of infectivity by the *Plasmodium berghei* sporozoite. *J. Parasitol.* *61*, 43-50.
- Wear, M.A., and Cooper, J.A. (2004). Capping protein: new insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 418-427.
- Yamashita, A., Maeda, K., and Maeda, Y. (2003). Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J.* *22*, 1529-1538.

Table 1: *cpβ(-)* parasites are deficient in salivary gland colonization

<u>Development in <i>Anopheles</i></u>	<u>day</u>	<u><i>cpβ(-)</i>^a</u>	<u>WT</u>
mosquito infectivity	10	49% (10)	77% (3)
oocyst sporozoites	14	10,600 (10)	62,500 (3)
	17	7,700 (4)	N/D
	30	5,400 (4)	N/D
hemocoel sporozoites	16	120 (5)	4,700 (2)
salivary gland sporozoites	17	29 (9)	17,000 (7)
	30	25 (4)	N/D

^a Data are from two clones (II4 and III2) that are phenotypically identical.

Shown are mean values; N is given in brackets. N/D; not determined.

Table 2. *CPβ(-)* parasites are non-infectious to the mammalian host.

Parasite		Number of animals	Prepatency
<u>Population</u>	<u>Inoculum^b</u>	<u>infected^c</u>	<u>(days)^d</u>
WT	5 infect. mq.	8 / 8 (100%)	3.5
<i>cpβ(-)</i> ^a	5 infect. mq.	0 / 2 (0%)	N/A
	10 infect. mq.	0 / 2 (0%)	N/A
	> 50 infect. mq.	0 / 2 (0%)	N/A
WT	100,000 i.v.	10 / 10 (100%)	5.4
<i>cpβ(-)</i> ^a	50,000 i.v.	0 / 3 (0%)	N/A
	100,000 i.v.	0 / 5 (0%)	N/A
	880,000 i.v.	0 / 1	N/A

^a Data are from two clones (II4 and III2) that are phenotypically identical.

^b Infection was either by intravenous (i.v.) injection of purified midgut sporozoites or by exposure to bites of infected mosquitoes (infect. mq.) at the numbers indicated.

^c Highly susceptible animals, i.e. young Sprague/Dawley rats and C57bl/6 mice, were used for intravenous and by bite infections, respectively. Animals were monitored by daily microscopic examination of Giemsa-stained blood smears for up to 28 days.

^d The pre-patent period is the time until first detection of blood stage parasites.

N/A; not applicable.

Ganter *et al.*, Figure 1

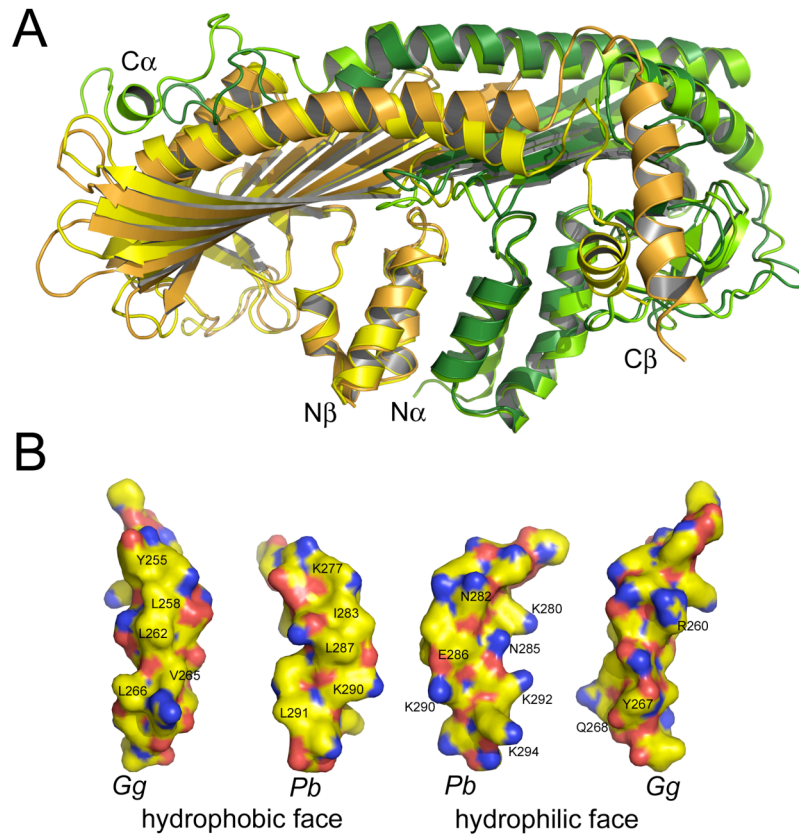


Figure 1. Homology model of *Plasmodium* capping protein (CP). (A) Superposition of a structural model of the *Plasmodium berghei* CP heterodimer onto the crystal structure of the chicken CapZ heterodimer. The α subunits of *P.berghei* and chicken CP are shown in dark and light green, and the β subunits of *P.berghei* and chicken CP are shown in yellow and gold, respectively. The positions of the N- and C-termini are indicated. (B) Amphipathic characters of the C-terminal tentacle extensions of parasite (*Pb*) and chicken (*Gg*) CP β . Key side chains contributing to the amphipathic character are indicated.

Ganter *et al.*, Figure 2

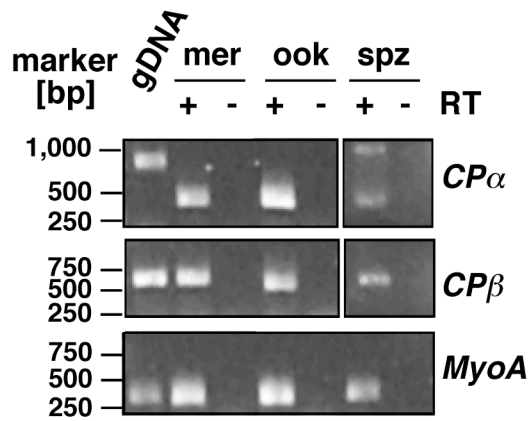


Figure 2. *Plasmodium CP* is expressed in all motile parasite stages. Presence of *CPβ*, *CPα*, and the unconventional class XIV myosin *MyoA* was tested for transcript expression in three invasive *Plasmodium* stages: merozoites (mer) that invade erythrocytes, ookinets (oo) that penetrate the mosquito midgut, and sporozoites (spz) that invade the mammalian liver. *CPα* contains an intron that distinguishes amplification from gDNA and cDNA. No amplification is detectable in control reactions lacking reverse transcriptase (-RT).

Ganter *et al.*, Figure 3

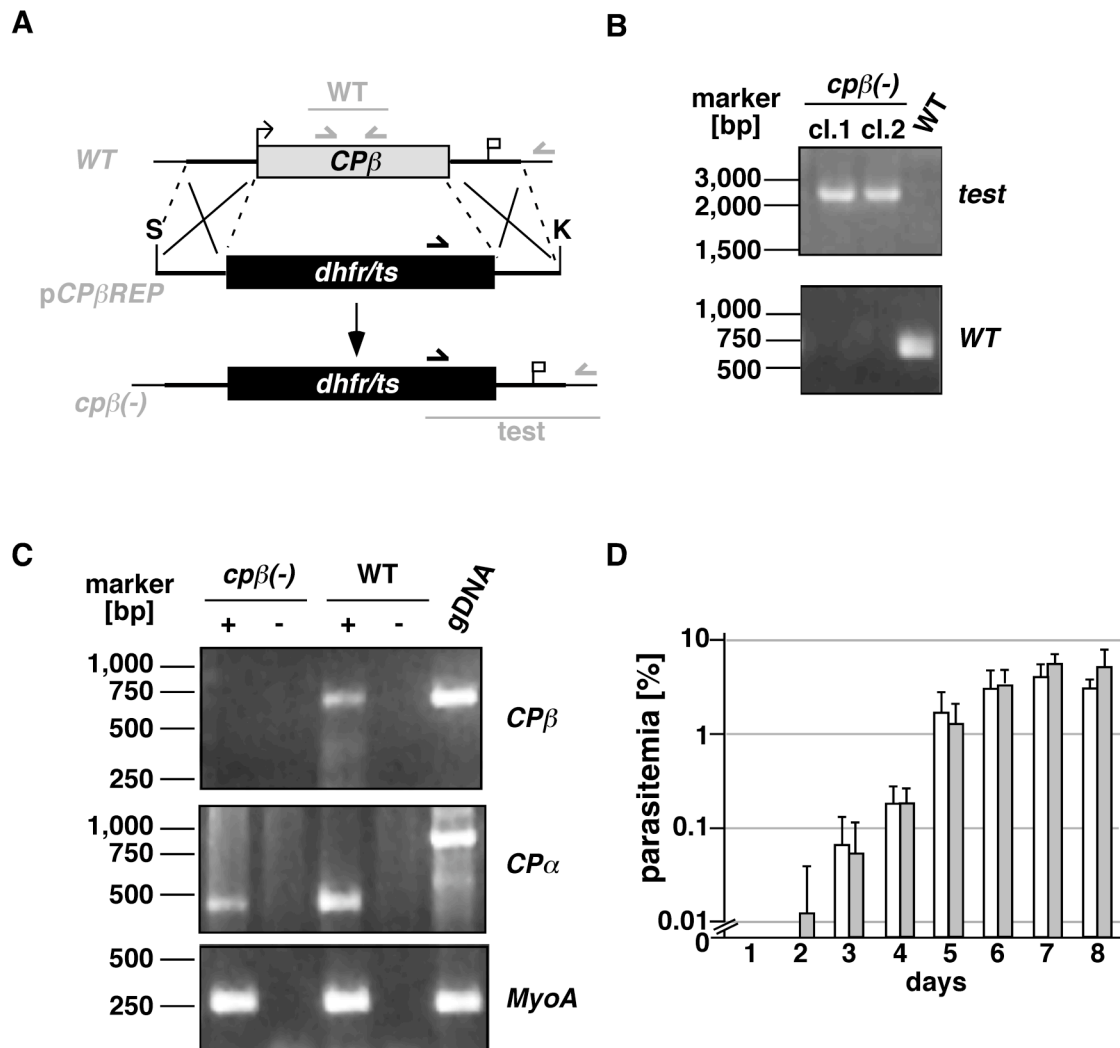


Figure 3. Targeted gene disruption of *P.berghei* $CP\beta$. (A) Replacement strategy to generate the $cp\beta(-)$ parasite. The wild-type (WT) $CP\beta$ genomic locus is targeted with a *Sac*II/*Kpn*I-linearized replacement plasmid containing the 5' and 3' untranslated regions of the $CP\beta$ open reading frame (ORF) and the *Toxoplasma gondii dhfr/ts*-positive selectable marker. Upon a double crossover event the $CP\beta$ ORF is replaced by the selection marker. Replacement-specific test primer combinations are indicated by arrows, and expected fragments are shown as lines. (B) Replacement-specific PCR analysis. Confirmation of the predicted gene targeting is achieved by specific primer combinations that can only amplify a signal from the recombinant locus. Black and grey arrows in (A) indicate primers that hybridize to regions in the plasmid backbone and within and outside the $CP\beta$ ORF, respectively. A WT-specific PCR reaction confirms the absence of residual wild-type parasites in the two clonal $cp\beta(-)$ populations. (C) Depletion of $CP\beta$ transcripts in $cp\beta(-)$ parasites. cDNA from wild-type and $cp\beta(-)$ merozoites was amplified at 35 PCR cycles. Note the absence of a $CP\beta$ -specific signal compared to a transcript control (*MyoA*). (D) $cp\beta(-)$ parasites develop normally in the mammalian host. Asexual blood stage development was determined by i.v. injection of 1,000 infected erythrocytes. Parasitemia of recipient animals (N=5) was determined by daily quantification of Giemsa-stained blood smears.

Ganter *et al.*, Figure 4

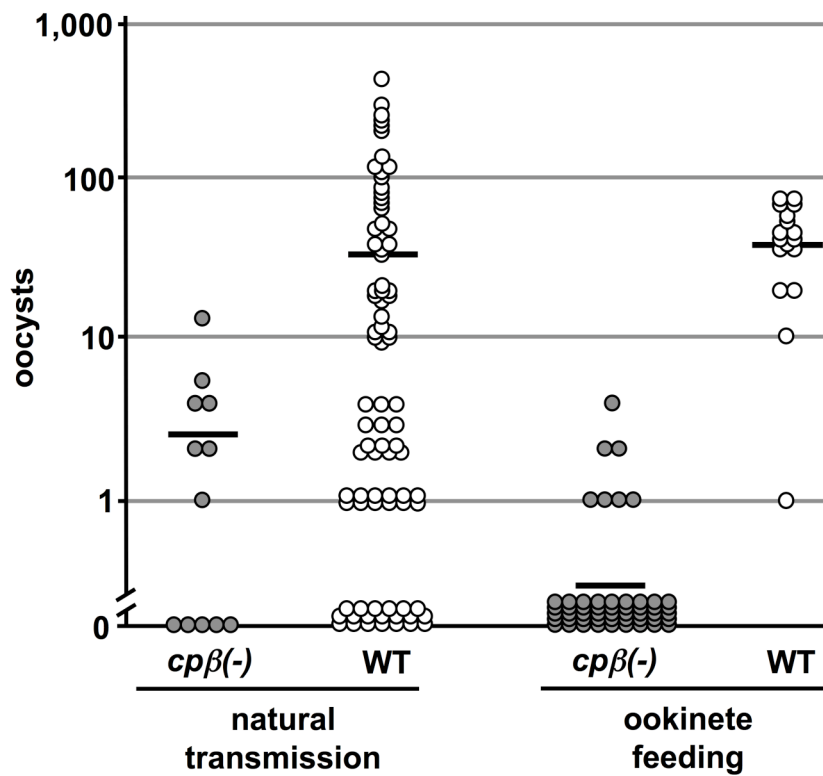


Figure 4. Loss of *CPβ* function precludes high oocyst densities. Quantification of oocyst numbers in *A. stephensi* mosquitoes that were either infected by natural transmission or by membrane-feeding of *in vitro* cultured ookinetes. *cpβ(-)*- and WT oocyst numbers and the average are shown as grey and white circles and bars, respectively.

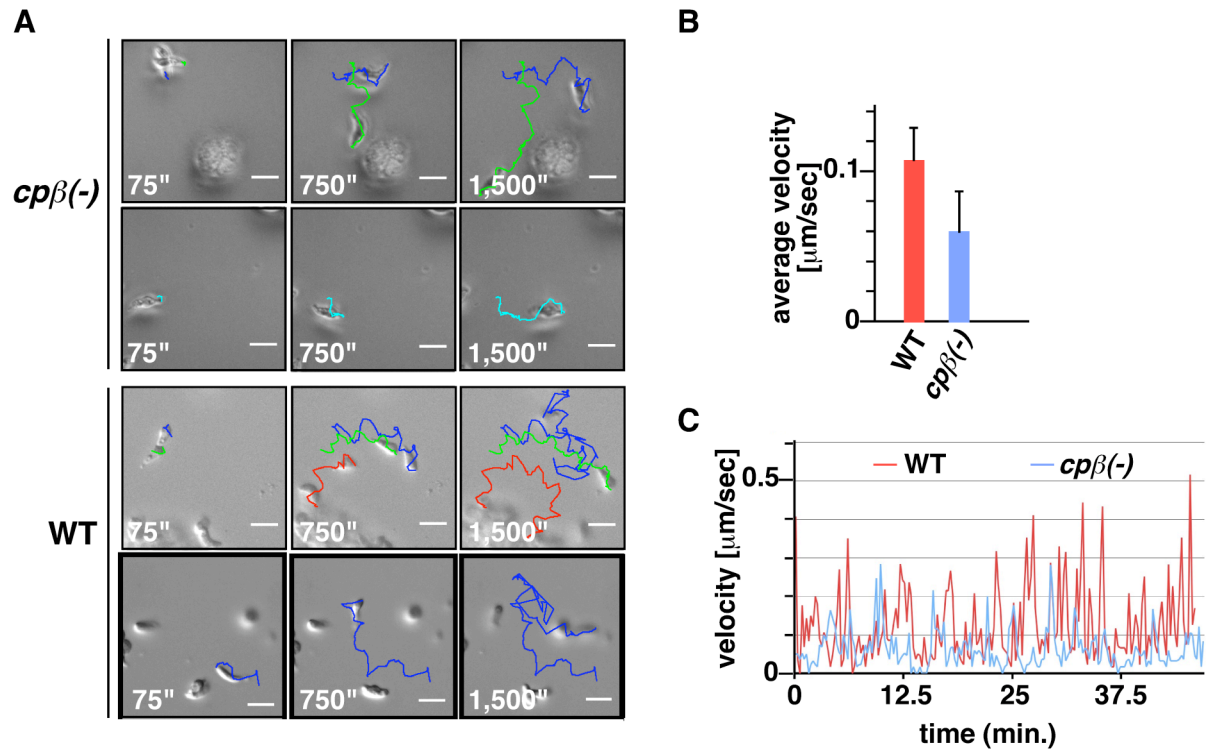


Figure 5. Impaired ookinete motility in $cp\beta(-)$ parasites. (A) Time-lapse micrographs of cultured $cp\beta(-)$ (top) and WT (bottom) ookinetes. Shown are the 75, 750 and 1,500 sec time points. Both ookinete populations display productive motility as evidenced by the coloured traces. Scale bars, 10 μm . (B) Quantification of ookinete motility. The average speed of WT (red) and $cp\beta(-)$ (blue) ookinetes was quantified from 12 and 25 representative ookinetes, respectively. (C) Representative quantification of velocities in WT and $cp\beta(-)$ ookinetes over a recording period of 50 min.

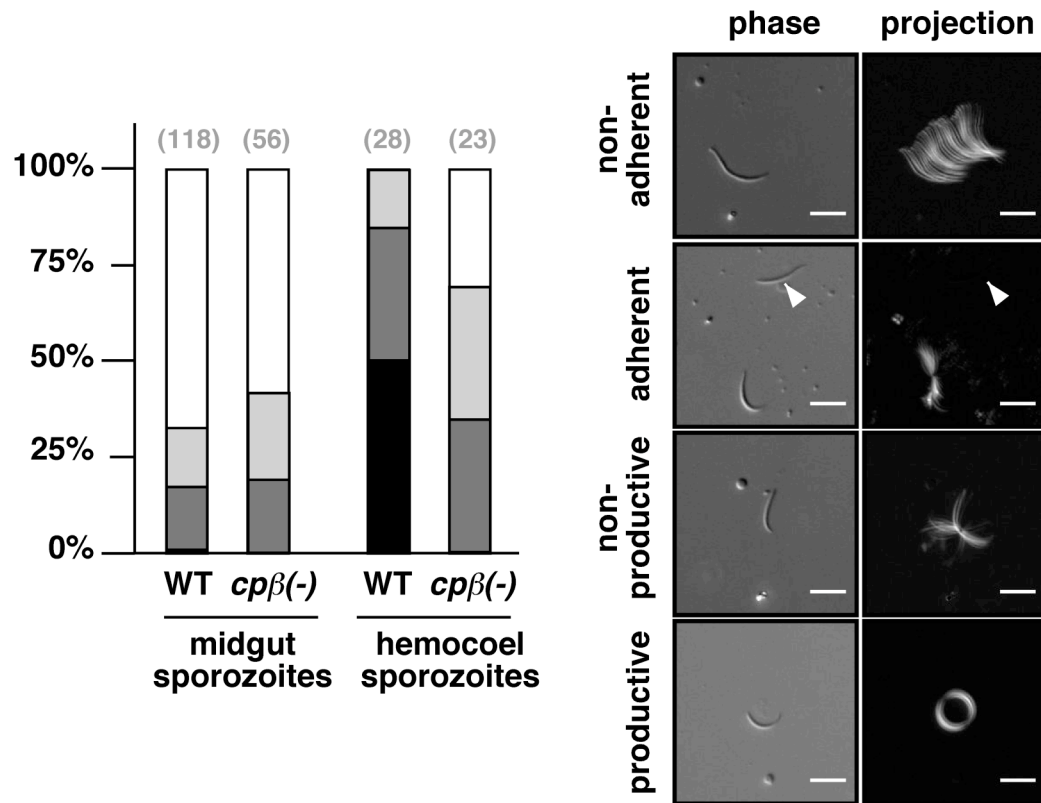


Figure 6. *CPβ* is essential for sporozoite gliding locomotion. Quantification of motility patterns in midgut and hemocoel-associated sporozoites from WT and *cpβ(-)* mutants (left). Shown is the percentage of non-motile, i.e. detached (white) and attached (light grey), sporozoites and sporozoite that display non-productive (dark grey) and productive (black) motility. In contrast to WT sporozoites that mature upon egress to the mosquito hemocoel *cpβ(-)* parasites remain non-gliding. Track projections (projections) and phase micrographs at time point 0'' (phase) of representative motility patterns of hemocoel sporozoites are shown on the right. On coated glass slides WT sporozoites glide in circles at an average speed of 1-3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (bottom panels). In marked contrast, *cpβ(-)* sporozoites display only non-productive motility patterns, such as bending and flexing and pendulum movement (upper panels). Scale bars, 10 μm .

Supplemental material

Supplemental Table I: *cpβ(-)* parasites produce gametocytes and ookinetes

Experiment	Parasite ^a	% Gametocytes ^b		
		Female	Male	<i>in vitro</i> ookinetes (x10 ⁶) ^c
1	<i>cpβ(-)</i>	2.3 (± 1.1)	0.5 (± 0.4)	0.4 (± 0.2)
	WT	2.5	1.6	3.6
2	<i>cpβ(-)</i>	2.8 (± 0.3)	2.0 (± 1.2)	0.5 (± 0.05)
	WT	1.5	0.7	0.6
3	<i>cpβ(-)</i>	4.8 (± 1.8)	1.6 (± 0.8)	18 (± 12)
	WT	5.6	0.8	10

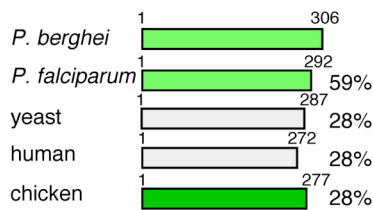
^a Data are from triplicates and at least duplicates for the *cpβ(-)* and WT parasites, respectively.

^b Gametocytes were counted by examination of Giemsa-stained blood smears on day of optimal exflagellation and are shown as percentage of total blood-stage parasites.

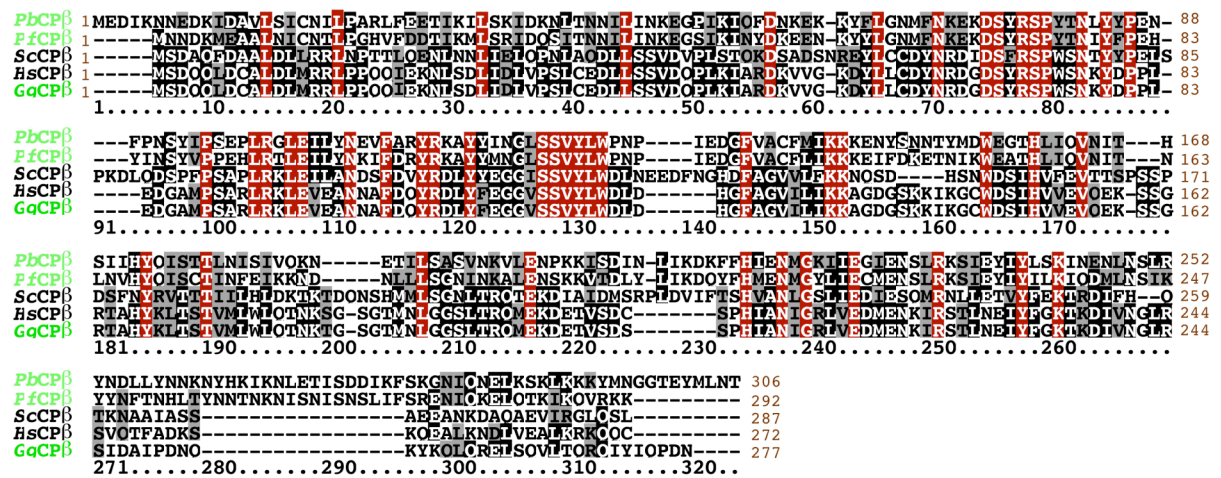
^c Ookinetes were cultured overnight at ambient temperature and counted with a hemocytometer.

Ganter *et al.*, Suppl. Figure 1

A

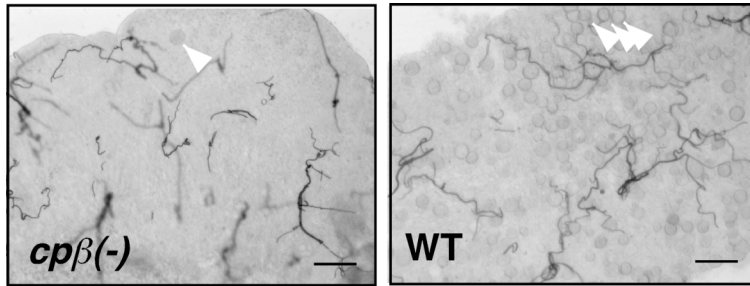


B



Suppl. Figure 1. Sequence alignments of *Plasmodium* capping protein subunits. (A) Primary structure of *Plasmodium*, yeast, human and chicken CP β . Amino acid sequence identities of the CP beta subunits are indicated as percentages of identical amino acid residues compared with the *P. berghei* sequences. (B) Alignment of CP β sequences from *Plasmodium berghei* (*PbCPβ*; XM_674749), *P.falciparum* (*PfCPβ*; XM_001351679), *Saccharomyces cerevisiae* (*ScCPβ*; X62630), human (*HsCPβ*; AAI09243), and chicken (*GgCPβ*; NM_205437). Strictly conserved amino acid residues are boxed in dark red.

Ganter *et al.*, Suppl. Figure 2



Suppl. Figure 2. *cpβ(-)* parasites produce fewer oocysts. Representative phase contrast images of isolated *Anopheles stephensi* midguts that were either fed on a *cpβ(-)*- or a WT-infected mouse 10 days earlier. Mature oocysts are indicated by white arrowheads. Scale bars, 100 μm .

Legends to Suppl. Movies

Suppl. Movie 1. Gliding motility of *cpβ(-)* ookinetes on glass slides, co-incubated with MOS20 cells. Pictures were taken in 15 sec. intervals. Total time: 25 min. Scale bar, 10 μm .

Suppl. Movie 2. Gliding motility of *WT* ookinetes on glass slides, co-incubated with MOS20 cells. Pictures were taken in 15 sec. intervals. Total time: 25 min. Scale bar, 10 μm .

Suppl. Movie 3. Typical, continuous, and circular gliding locomotion of *WT* hemocoel sporozoites on glass slides, co-incubated with 3% bovine serum albumine. Pictures were taken in 2 sec. intervals. Total time: 100 sec. Scale bar, 10 μm .

Suppl. Movie 4. Non-productive gliding motility of *cpβ(-)* hemocoel sporozoites on glass slides, co-incubated with 3% bovine serum albumine. Pictures were taken in 2 sec. intervals. Total time: 100 sec. Scale bar, 10 μm .

II

**Structural Basis for Parasite-Specific Functions of the
Divergent Profilin of *Plasmodium falciparum*.**

Structural Basis for Parasite-Specific Functions of the Divergent Profilin of *Plasmodium falciparum*

Inari Kursula,^{1,*} Petri Kursula,¹ Markus Ganter,² Santosh Panjikar,³ Kai Matuschewski,² and Herwig Schüler^{2,4,*}

¹Department of Biochemistry, University of Oulu, 90570 Oulu, Finland

²Department of Parasitology, Heidelberg University School of Medicine, 69120 Heidelberg, Germany

³EMBL Hamburg Outstation, DESY, 22603 Hamburg, Germany

⁴Structural Genomics Consortium, Karolinska Institute, 17177 Stockholm, Sweden

*Correspondence: inari.kursula@oulu.fi (I.K.), hersch@ki.se (H.S.)

DOI 10.1016/j.str.2008.09.008

SUMMARY

Profilins are key regulators of actin dynamics. They sequester actin monomers, forming a pool for rapid polymer formation stimulated by proteins such as formins. Apicomplexan parasites utilize a highly specialized microfilament system for motility and host cell invasion. Their genomes encode only a small number of divergent actin regulators. We present the first crystal structure of an apicomplexan profilin, that of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, alone and in complex with a polyproline ligand peptide. The most striking feature of *Plasmodium* profilin is a unique minidomain consisting of a large β -hairpin extension common to all apicomplexan parasites, and an acidic loop specific for *Plasmodium* species. Reverse genetics in the rodent malaria model, *Plasmodium berghei*, suggests that profilin is essential for the invasive blood stages of the parasite. Together, our data establish the structural basis for understanding the functions of profilin in the malaria parasite.

INTRODUCTION

Plasmodium species, the causative agents of malaria, form invasive extracellular stages, such as the erythrocyte-invading merozoites. Parasite locomotion and host cell entry are active mechanisms that are driven by the parasite's own actin/myosin motor. According to the current model, parasite transmembrane proteins engage surface ligands and bind to unusually short actin filaments underneath the parasite plasma membrane. An array of immobilized myosins moves these receptor-ligand complexes backward, resulting in net forward movement of the parasite (Bergman et al., 2003; Russell and Sinden, 1981; Soldati and Meissner, 2004). Low abundance of cytosolic parasite actin polymers (Field et al., 1993; Schmitz et al., 2005) is consistent with the parasite actin's intrinsic low propensity to polymerize (Sahoo et al., 2006; Schüler et al., 2005). As a consequence, the parasite motor machinery critically depends on polymer nucleating and capping proteins, including formins. The Arp2/3 complex, an important actin nucleator in other phyla, is not encoded in apicomplexan genomes (Gordon and Sibley, 2005).

Profilins are ubiquitous and essential actin monomer binding proteins, known to interact with proline-rich regions in a variety of proteins and to regulate actin filament formation (Jockusch et al., 2007; Witke, 2004). Profilin was originally discovered as an actin-sequestering protein that kept actin in a nonpolymerized, "profilamentous" form (Carlsson et al., 1977). Profilin binding to proline-rich sequences in microfilament regulators such as VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) (Tanaka and Shibata, 1985) and Diaphanous and other formins (Evangelista et al., 1997; Watanabe et al., 1997), however, suggested a more complicated role in cytoskeletal regulation. For fast actin polymerization at selected sites, profilin is an essential control element by recruiting actin monomers in a polymerizable form to actin polymerization machineries (Loisel et al., 1999; Romero et al., 2004).

Profilins are usually defined by their shared, highly conserved structure (Schutt et al., 1993; Thorn et al., 1997) and by their ability to bind actin, proline-rich sequences (Björkegren et al., 1993; Kursula et al., 2008; Mahoney et al., 1997) and inositol phosphates (Chaudhary et al., 1998; Lambrechts et al., 2002). However, virus profilins (Blasco et al., 1991; Machesky et al., 1994), the endosome adaptor protein p14 (Qian et al., 2005), and SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteins (Gonzalez et al., 2001) represent examples of a conserved tertiary structure in the absence of primary structural and functional homology. Therefore, classification of divergent profilin sequences and their functional assignment remain difficult. In this study, we provide a structural framework for understanding the functions of a divergent pathogen profilin that plays a vital role for *Plasmodium falciparum*.

RESULTS

Apicomplexan Parasites Encode a Single Profilin Gene

Genomes of parasites in the phylum *Apicomplexa* contain sequences that are readily recognized as profilin orthologs (Schüler and Matuschewski, 2006). These orthologs are unusually long, owing to an 18-residue insertion before α helix 2 and a second insertion after β strand 2 that spans 10 residues in *Plasmodium* and 4 in other parasite species (Figure 1). Overall, these insertions are rather conserved among *Plasmodium*, but less so in other apicomplexan parasites, such as *Cryptosporidium* or *Toxoplasma*. Inspection of the residues in the inferred actin-, polyproline-, and lipid-binding sites shows that none of these sites are particularly well conserved, with nonconserved substitutions in all of them. Thus, judging from their sequences, it is not

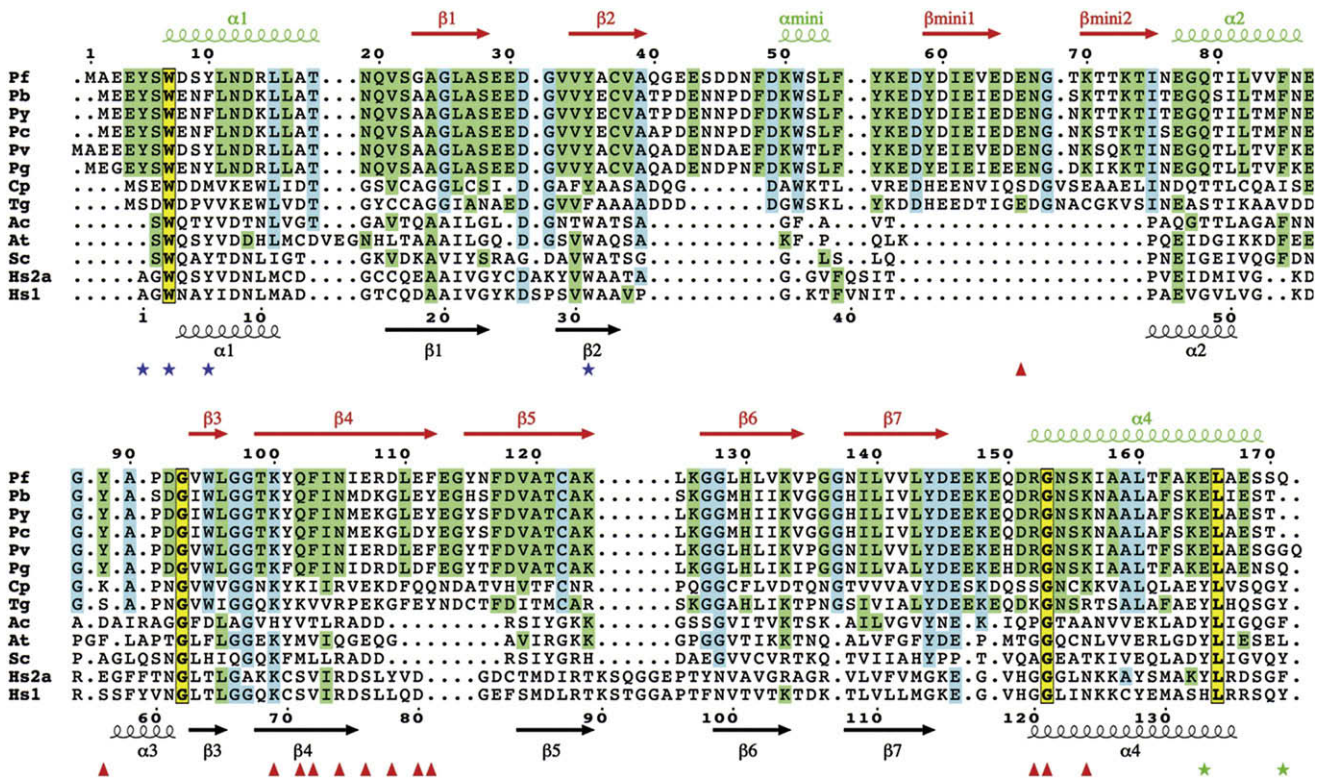


Figure 1. Sequence Alignment of Profilins Illustrating the *Plasmodium*- and *Apicomplexa*-Specific Features

A structure-based sequence alignment was constructed for several profilins from different species, representing the four kingdoms of *Eukarya*, with known 3-dimensional structure, and parasite profilins were then aligned to *PfPfn* based on sequence. Secondary structure elements are indicated for *PfPfn* and *HsPfn1* above and below the respective sequences. Residue numbering refers to *PfPfn* (above) and *HsPfn1* (below the alignment). The numbering of the α -helices and β strands follows that of the canonical profilin fold. Note that α -helix 3 is missing in the *Apicomplexa*. The secondary structure elements of the novel minidomain are numbered separately. Residues discussed in the text are marked as follows: blue asterisks, *PfPfn* residues involved in polyproline binding; green asterisks, additional residues in other profilins binding polyproline; red arrowheads, putative actin interacting residues in *PfPfn*. Strictly conserved residues are boxed yellow (conserved among all species); blue (conserved among *Apicomplexa*); and green (conserved in *Plasmodium* species). Shown are the sequences of the profilins of *P. falciparum* (gi:23613835), *P. berghei* (EU735101), *P. vivax* (gi:148800934), *P. chabaudi* (gi:70949341), *P. yoelii* (PlasmoDB PY00917), *P. gallinaceum* (PlasmoDB Pg_2265551), *Cryptosporidium parvum* (gi:126644761), *Toxoplasma gondii* (gi:6078611), *Acanthamoeba castellanii* isoform 1b (Q95VF7), *Arabidopsis thaliana* isoform 1 (gi:15224838), *Saccharomyces cerevisiae* (gi:6324696), and *Homo sapiens* isoforms 2a (gi:16753215) and 1 (gi:30584265).

apparent whether these profilin-like proteins of *Apicomplexa* have retained the typical profilin functions.

***Plasmodium falciparum* Profilin Displays the Key Biochemical Characteristics of Profilins**

The *P. falciparum* profilin (*PfPfn*) coding sequence, amplified from merozoite-derived cDNA, was used for recombinant protein production. We first probed the actin binding activity of *PfPfn* by a standard sedimentation assay (Figure 2A). *PfPfn* is capable of sequestering actin monomers under polymerizing conditions, albeit not to the same extent as recombinant human profilin 1 (*HsPfn1*) produced by the same strategy. This is in agreement with a recent analysis of *Toxoplasma gondii* profilin (Plattner et al., 2008).

Binding to proline-rich sequences is a second hallmark of profilins. We performed pull-down assays using polyproline sepharose beads (Figure 2B). *PfPfn* binds to polyproline sepharose, but less efficiently than bovine profilin 1 (*BtPfn1*; sharing 97% identity with the human ortholog) or GST-tagged human profilin 2.

A third property of profilins is their ability to bind phosphoinositols. To explore *PfPfn* phospholipid binding, we employed pro-

tein overlay assays using nitrocellulose membranes spotted with an array of different phosphoinositol phosphates and related lipids (Figure 2C). *BtPfn1* bound $PI(3,4,5)P_3$ and, with lower efficiency, $PI(4,5)P_2$, a difference that has been observed before (Lu et al., 1996). *BtPfn1* also bound $PI(3)P$, $PI(4)P$, and $PI(5)P$. The parasite profilin clearly bound to the three phosphoinositol monophosphates and to phosphatidyl acid, but binding to neither $PI(4,5)P_2$ nor $PI(3,4,5)P_3$ was detectable (Figure 2C). The binding was not affected by a C-terminal hexahistidine tag (data not shown). We conclude that *Plasmodium* profilin binds certain membrane phospholipids, but the binding specificity is more reminiscent of the adaptor protein p14 (Qian et al., 2005) than of typical profilins.

***Plasmodium falciparum* Profilin Contains a Novel Minidomain with *Plasmodium*- and *Apicomplexa*-Specific Moieties**

We solved the crystal structure of *PfPfn* at 2.3 Å resolution. Overall, the structure has the conserved core profilin fold with a central antiparallel 7-stranded β sheet covered by 2 α helices on each of its faces (Figure 3A). The rmsd between 122 C α -atoms of the

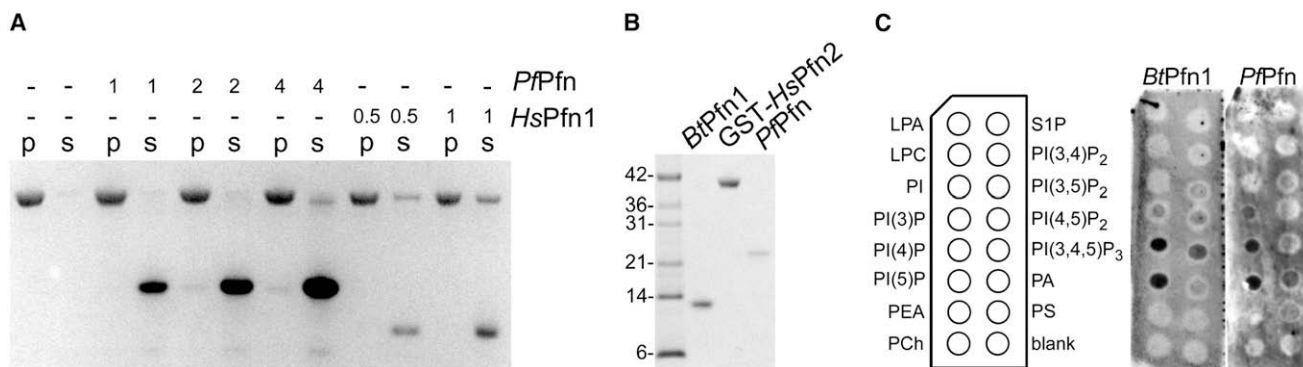


Figure 2. Biochemical Properties of *Plasmodium falciparum* Profilin

(A) *Plasmodium* profilin weakly sequesters actin monomers. Actin (5 μ M) was induced to polymerize alone (left lanes) or in the presence of different molar ratios of *PfPfn* or *HsPfn1* (molar ratios of profilin/actin are indicated above the respective lanes). Coomassie-stained gels of equal amounts of pellet (p) and supernatant (s) fractions after ultracentrifugation are shown. Note that high concentrations of *PfPfn* were needed to shift actin into the nonpolymerized supernatant fraction. (B) Binding of profilins to polyproline sepharose. Equal amounts of profilin 1 purified from calf thymus (*BtPfn1*), human GST-profilin 2 (*GST-HsPfn2*), and *PfPfn* were passed over polyproline sepharose. Bound proteins were detected by denaturing electrophoresis and Coomassie staining. (C) Binding of profilin to phospholipids as assessed by protein-phospholipid overlay using PIP strips. The location of the different phospholipids is indicated on the left. Proteins used were profilin 1 purified from calf thymus (*BtPfn1*), and *P. falciparum* profilin produced as an N-terminal hexahistidine fusion protein and liberated from the His6 tag by protease cleavage (*PfPfn*).

superimposed *PfPfn* and *HsPfn1* is 2.21 Å, with a sequence identity of only 18% for the superimposed residues. Comparing sequences of profilins from all four eukaryotic kingdoms (Figure 1), there are only 4 residues that are strictly conserved; Trp7 is involved in the binding of proline-rich peptides, Gly93 is at the actin-binding interface, and Gly153 and Leu166 are in the C-terminal helix, which is normally involved in contacts with both actin and proline-rich ligands.

The structure has several features that make *PfPfn* unique among all profilin structures known to date (Figure 3B). The most intriguing feature is a novel minidomain located between β strand 2 and α -helix 2 (Figure 1) that extends from one face of the protein (Figure 3). It consists of a *Plasmodium*-specific loop, followed by a short α -helix and a large β -hairpin protrusion, which is a unique feature of apicomplexan profilins.

The large arm-like β -hairpin protrusion spans 18 residues from residue 57 to 74. The N-terminal half of the insertion, the outgoing β strand that is predicted to interact with actin (see below), is rather conserved among *Apicomplexa*, but the C-terminal half has more variation. The protrusion is anchored to the core domain by a network of interactions at its base; Lys73 forms a salt bridge with Asp92, Ile61 and Ile75 form hydrophobic or CH- π interactions with Trp95, and Glu77 interacts with the backbone amides of Lys56, Gly97, and Gly98 and the side chain of Tyr59 (Figures 3C and 3D). In addition, Ile75 interacts with the Tyr59 aromatic ring via a CH- π bond. In the crystal structure, the entire hairpin structure is well defined and rigid (see Figure S1 available online); although it may have some degree of mobility in solution, the aforementioned interactions define its orientation to a large extent. This β -hairpin is not predicted to interfere with any of the known binding sites of profilin, but based on its orientation and distribution of surface charges, it might participate in interactions with actin, as discussed below.

The *Plasmodium*-specific loop, spanning residues 40–49, is located between β strand 2 and the short helix of the minidomain (Figures 1, 3B, and 3C). This loop is also in the direct vicinity of

the N-terminal helix. This loop is highly acidic with 2 glutamates and 1 aspartate in *PfPfn*. Notably, the charges, but not their exact positions, are conserved among *Plasmodium* profilins. In the crystal structure, this loop is mobile, having weak electron density and high B-factors. This loop extends from a face not known to bind ligands in other profilins.

Compared with other profilins, β strands 4 and 5 in the putative actin binding site of *PfPfn* are extended at their C and N termini, respectively. These extensions form the third parasite-specific structural element protruding from the central profilin fold. At the opposing face, the connection between strands 5 and 6 is much shorter than in human profilins 1 and 2a (Figure 3B), a widespread feature shared with plant, amoeba, and yeast profilins.

Comparing the topology of *PfPfn* and other profilins, it is noteworthy that consensus α -helix 3 is missing in *PfPfn*, and that α helix 4 of *PfPfn* is the short helix of the unique minidomain. Consequently, 2 helices cover the central β sheet on each side, as in the canonical fold, but with different positions in the general topology of the protein.

Because the hallmarks of the *Plasmodium* profilin structure are likely to be present in the profilin of the related parasite *T. gondii*, we modeled *TgPfn* based on our *PfPfn* crystal structure. *TgPfn* is predicted to have a similar arm-like protrusion on top of the canonical profilin fold, but the acidic loop is shorter, as in conventional profilins (Figures 3C and S2).

Binding of Proline-Rich Sequences Involves the *Plasmodium*-Specific Residue Tyr5 but Not the C-Terminal Helix

In addition to the unliganded structure, we solved the structure of *PfPfn* bound to an octaproline peptide at a resolution of 1.89 Å (Figure 4). All 8 residues of the peptide are well defined in electron density, and the orientation of the peptide could be unambiguously determined. Apart from two minor differences, the apo and peptide bound structures are virtually identical. In the liganded structure, the N terminus, including Tyr5, has slightly

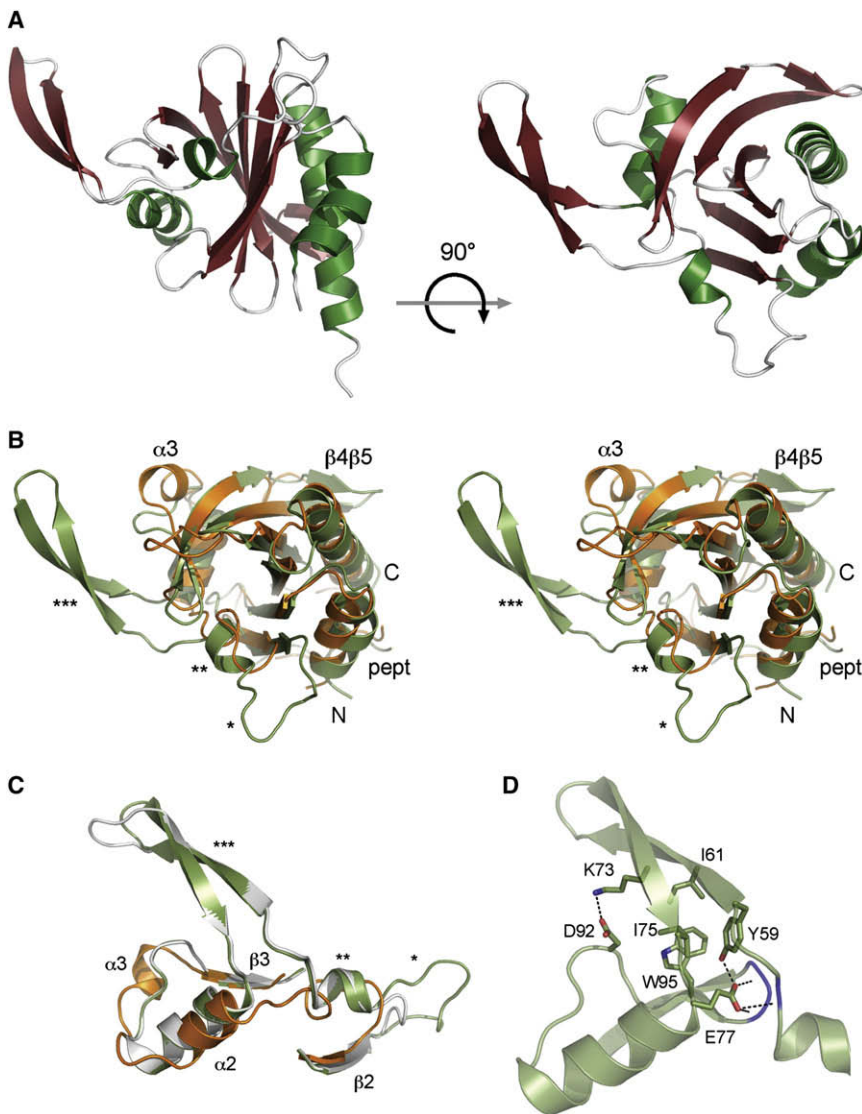


Figure 3. Crystal Structure of *Plasmodium falciparum* Profilin

(A) The *PfPfn* structure is an $\alpha/\beta/\alpha$ sandwich, where the central 7-stranded β sheet is covered by 2 α helices on both faces. Note the long arm-like β -stranded protrusion. The two views presented are related by a 90° rotation about the x axis.

(B) Superposition between *PfPfn* (green) complexed with an octaprolin peptide and mouse profilin 2a (orange) complexed with a peptide from mDia1, determined at atomic resolution (Kursula et al., 2008). The major differences between *PfPfn* and other known profilin structures are the loop connecting β strands 4 and 5 and the three parts of the minidomain: the *Plasmodium*-specific acidic loop (*); the additional helix of the minidomain (**); and the arm-like protrusion (***). The N and C termini and the bound peptides are labeled. (C) Structure of the novel minidomain. Superimposed are mouse profilin 2a (orange), *PfPfn* (green), and the homology model of *TgPfn* (white). Note that the hairpin protrusion in *TgPfn* is one residue longer than in *PfPfn*, whereas the acidic loop is much shorter. The additional short helix is present in both apicomplexan profilins, but absent in other profilins. The secondary structure elements shown are labeled and the parts of the minidomain are marked as in panel B.

(D) Interactions of the stem of the hairpin protrusion with the profilin core fold. Hydrogen bonds are indicated as dashed lines. Three of the contacts from Glu77 are to main chain amides (blue).

moved to make space for and interact with the peptide (Figure S3). Also the *Plasmodium*-specific acidic loop, away from the peptide-binding site, is in a slightly different conformation in the apo and liganded crystal forms. Thus, as seen in other profilin structures (Kursula et al., 2008), the majority of the binding site for proline-rich sequences is preformed already in the unliganded state.

The polyproline binding site is formed by 4 aromatic side chains (Figure 4B). Three of these reside in the N terminus (Tyr5) and N-terminal helix (Trp7, Tyr10) and one in β strand 2 (Tyr35). Four of the proline residues are stacked against these aromatic side chains, forming CH- π interactions with each of the aromatic rings. Furthermore, 2 direct hydrogen bonds exist between the peptide backbone carbonyls and the side chains of Tyr5 and Trp7. Tyr5 is unique for *Plasmodium*, whereas Trp7 and an aromatic residue at the position of Tyr35 are strictly conserved across profilins. Incidentally, other *Apicomplexa*, such as *Cryptosporidium parvum* and *T. gondii*, lack the tyrosines in positions 5 and 10, but feature a unique tryptophan in position

residues, the polyproline binding mode of *PfPfn* is very similar to that of other profilins (Figure S3B).

Implications for Actin Binding

Residues involved in the interaction between profilin and actin have been thoroughly characterized by structural (Ferron et al., 2007; Schutt et al., 1993) and mutational (Korenbaum et al., 1998; Schlüter et al., 1998) analyses. Although the binding interface is extensive, only a handful of side chains make direct contact with each other. Notably, all the side chains contributed to profilin binding by actin are conserved between mammalian and *Plasmodium* actins. In contrast, the side chains contributed to the binding interface by profilin are poorly conserved. To compare actin binding residues in mammalian and *Plasmodium* profilins, a homology model of the *Plasmodium* profilin-actin complex was constructed based on the recent high-resolution structure of the human profilin 1-rabbit actin complex (Ferron et al., 2007). The actin binding site of *PfPfn* is mainly built around β strands 4 and 5 and the loop regions surrounding them

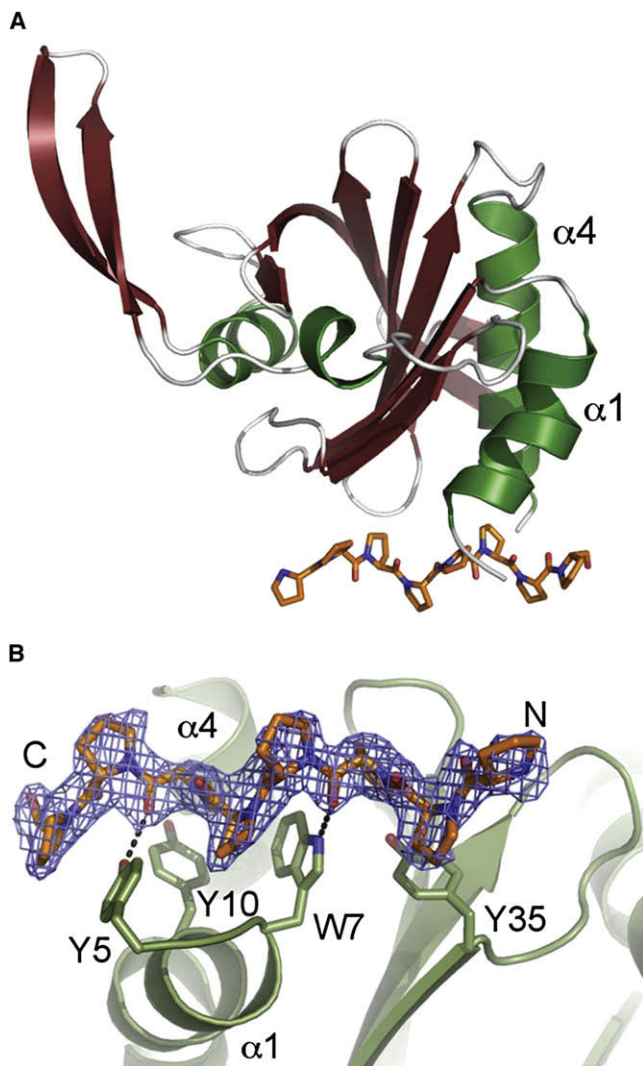


Figure 4. Structure of the *Plasmodium falciparum* Profilin Bound to an Octaproline Peptide

(A) Overview of the structure with the peptide. The N- and C-terminal helices ($\alpha 1$ and $\alpha 4$, respectively) are labeled.

(B) Structure of the polyproline-binding site. The side chains of the 4 aromatic residues forming the binding site are shown. The C-terminal α -helix ($\alpha 4$) does not participate in binding interactions as in mammalian and yeast profilins; instead, the N terminus turns back toward the peptide (in orange), allowing the *Plasmodium*-specific Tyr5 to engage in an intimate interaction with the peptide (Figure S3). The two direct hydrogen bonds between the peptide and side chains of Tyr5 and Trp7 are shown as dashed lines. The N and C termini of the octaproline peptide are indicated. The electron density shown is the final refined $2F_o - F_c$ map contoured at 1σ .

(Figure 5). Due to differences in the lengths of these secondary structure elements, the binding interface appears slightly shifted. The model also suggests that the arm-like β -hairpin protrusion of *PfPfn* is positioned to interact with actin (Figure 5A), as discussed in detail below.

A central profilin-actin interaction is a salt bridge formed between Glu82 of *HsPfn1* and Lys113 of actin. The corresponding residue in *PfPfn* is Phe117, which is conserved as a Phe or Tyr in all *Apicomplexa* except for *C. parvum* (Val). However, the glu-

tamates in positions 107, 109, and 111 might be suited to interact with the side chains of either *Pf*actin Lys113 or Arg372 (Figure 5B). Of general importance, human profilin appears to be exceptional in this interaction, because most profilin sequences contain an acidic side chain corresponding to *PfPfn* Glu107 and lack an acidic side chain corresponding to *HsPfn* Glu82 (Figure 1). Thus, it seems that also other profilins utilize alternative interactions with actin Lys113.

In the mammalian profilin-actin complex, the Tyr59 side chain of *HsPfn1* stacks against the actin His173 side chain (Figure 5B). In *PfPfn*, as well as other apicomplexan profilins, this loop is shorter ($_{88}GYAP_{91}$ as compared with $_{55}RSSFYV_{60}$ of *HsPfn1*) and adopts a different conformation. This may enable Tyr89 or Phe103, both present only in *Plasmodium* profilins, to form a similar interaction with actin His173 (Figure 5B). Surprisingly, in *TgPfn* and *CpPfn*, potential actin His173-interacting side chains are absent.

In the *HsPfn1*-actin complex (Ferron et al., 2007), the profilin Arg74 side chain is stacked against the C-terminal Phe375 in actin (Figure 5C). This arginine is present, for example, in *T. gondii* and *C. parvum* profilins, but in *Plasmodium*, this position is occupied by an asparagine (Asn105) and in plant profilins, by a glutamine (Figure 1). *PfPfn* may engage in a similar stacking interaction between the side chains of the *Plasmodium*-specific Arg152 in profilin and Tyr169 in actin. Also Lys156 in *PfPfn* could form a salt bridge with the C terminus of actin (Figure 5C).

Lys125 from the C-terminal helix of *HsPfn1* forms a salt bridge with Glu361 of actin. In *Plasmodium*, there do not seem to be any corresponding interactions (Figure 5C). The *HsPfn1* His119 side chain is sandwiched between the actin Tyr169 and Met355 side chains; also this interaction seems to be specific for mammalian profilin-actin complexes (Figure 5C).

The tip of the arm-like protrusion of *PfPfn*, which points toward a positively charged patch on actin, contains 3 acidic residues (Glu64, Asp65, and Glu66). In actin, a helix containing basic residues (Lys284, Arg290, and Lys291) comes close to the tip of this loop (Figures 5A and 5D). At the N terminus of this helix, there is an acidic loop with residues Asp286 and Asp288 interacting with Lys69 and Lys90 of *HsPfn1*. In *PfPfn*, only Lys100 could form a similar interaction. Lys100 is also the only actin-binding residue the exact position of which is conserved between *PfPfn* and other profilins.

In summary, our analysis suggests that the canonical actin binding site is less extensive in *PfPfn*, and that the loss of some of the interactions might be compensated for by additional interactions through the tip of the *Apicomplexa*-specific β -hairpin protrusion.

Residues Implicated in Phospholipid Binding

Mammalian and yeast profilins and the mouse endosome adaptor protein p14 all bind several phospholipids with different specificities, but the residues implicated in the interactions are conserved neither in the sequences nor in the 3-dimensional structures (Eads et al., 1998; Qian et al., 2005). In profilins, the phospholipid binding sites overlap with both the actin and the polyproline binding sites and involve a number of basic side chains (Lambrechts et al., 2002; Skare and Karlsson, 2002; Sohn et al., 1995). Mapping of these side chains onto the surface of *HsPfn1* (Figure S4) illustrates the location of 2 sites; one around the actin binding site (Lys69, Arg88, and Lys90), and

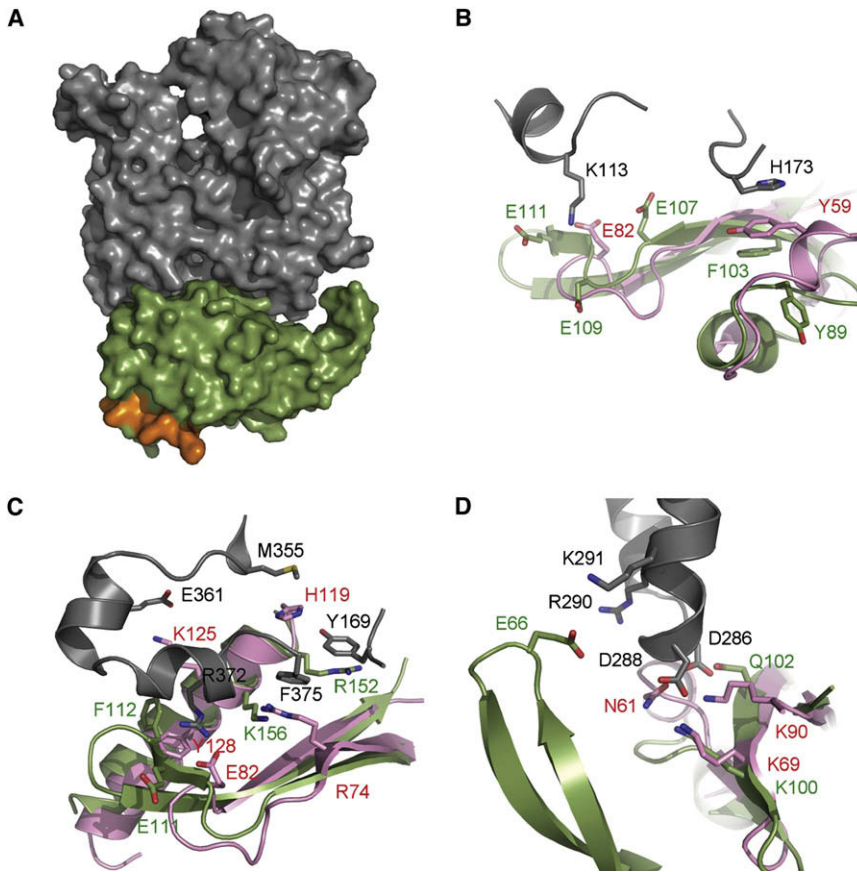


Figure 5. Overview of the Putative Actin-Binding Site

(A) Surface model of the complex of *Plasmodium* profilin (green) with actin (gray). Note the unique β -hairpin domain reaching upward toward actin on the right. The proline-rich peptide is shown in orange.

(B–D) Details of the three most important sites contributing to the profilin-actin interaction, as discussed in the text. Human profilin 1 and actin (Ferron et al., 2007) are shown in pink and gray, respectively. The *Plasmodium* profilin crystal structure superimposed with the human profilin 1 from the complex is shown in green.

the second at the end of the C-terminal helix (Arg135, Arg136, near the polyproline binding site). In *PfPfn*, these sites are only vaguely conserved and contain fewer arginines (Figure S4). Notably, although the exact positions of positively charged residues are not conserved, all arginines and most lysines are on the same face of the protein in both profilins. The presence of only 3 arginine residues in *PfPfn* may correlate with its experimentally determined specific interaction with inositol monophosphates and phosphatidylic acid (Figure 2C).

Profilin Expression Is Indispensable for the Parasite

Our structural analysis identified previously unrecognized features of the divergent profilin of *P. falciparum*. We addressed the *in vivo* role of profilin during life cycle progression of the malaria parasite in mammalian and mosquito hosts. We first probed expression of the profilin ortholog in the rodent malaria model *Plasmodium berghei*, where all extracellular parasite stages can be readily isolated, by RT-PCR (Figure 6A). Transcripts of *PbPfn* were detected in all life cycle stages tested, showing that profilin, similar to the motor myosin *MyoA*, is abundantly expressed in the invasive stages of the malaria parasite.

Abundant expression suggested that profilin is important for *Plasmodium* life cycle progression. We employed reverse genetics in *P. berghei* to examine whether *Pfn* is an essential parasite gene. A targeting vector was constructed to disrupt the endogenous *PbPfn* locus by allelic replacement via double homologous recombination (Figure 6B). Replacement of the *PbPfn* locus was unsuccessful in three independent transfection attempts

(Figure 6C). We next generated a control replacement plasmid that contained a functional full-length copy of human *Pfn1* under the control of the endogenous *PbPfn* promoter and a constitutive 3' untranslated region to permit proper transcript stability (Figure 6B). Transfection of this construct yielded viable parasites that contained the predicted allelic replacement at the first attempt (Figure 6C). Functional complementation of the *PbPfn* gene by the orthologous *HsPfn1* cDNA was confirmed in a second independent transfection experiment (data not shown). These findings show that (i) the *PbPfn* locus is readily accessible to homologous recombination, and (ii) human profilin can complement the essential role of the parasite protein. Together, our data strongly suggest that *Plasmodium* profilin is a bona fide profilin that performs essential roles for pathogenic blood stages of the malaria parasite.

DISCUSSION

Plasmodium and related apicomplexan parasites encode some of the most divergent members of the profilin family. As shown in this study, *PfPfn* adopts an overall core structure and displays biochemical properties that together allow for its classification as a conventional profilin. However, it also possesses a unique minidomain, including an arm-like β -hairpin protrusion common to apicomplexan parasites, and an acidic loop specific for *Plasmodium* species. Profilin is an essential gene for *Plasmodium* blood stages, making it a potential target for antimalarial drug development. Our *PfPfn* crystal structure and genetic characterization provide an incentive to further explore such a strategy.

In addition to the apo structure, the structure of *PfPfn* in complex with a polyproline peptide was solved, and *PfPfn* was shown to bind polyproline in solution. Profilins bind to proline-rich sequences in various regulatory proteins including formins, and the apicomplexan genomes encode up to 3 formin-like proteins (Schüler and Matuschewski, 2006). Similarly to other profilins, the binding site for the polyproline peptide consists of aromatic residues. Even though not all positions are conserved,

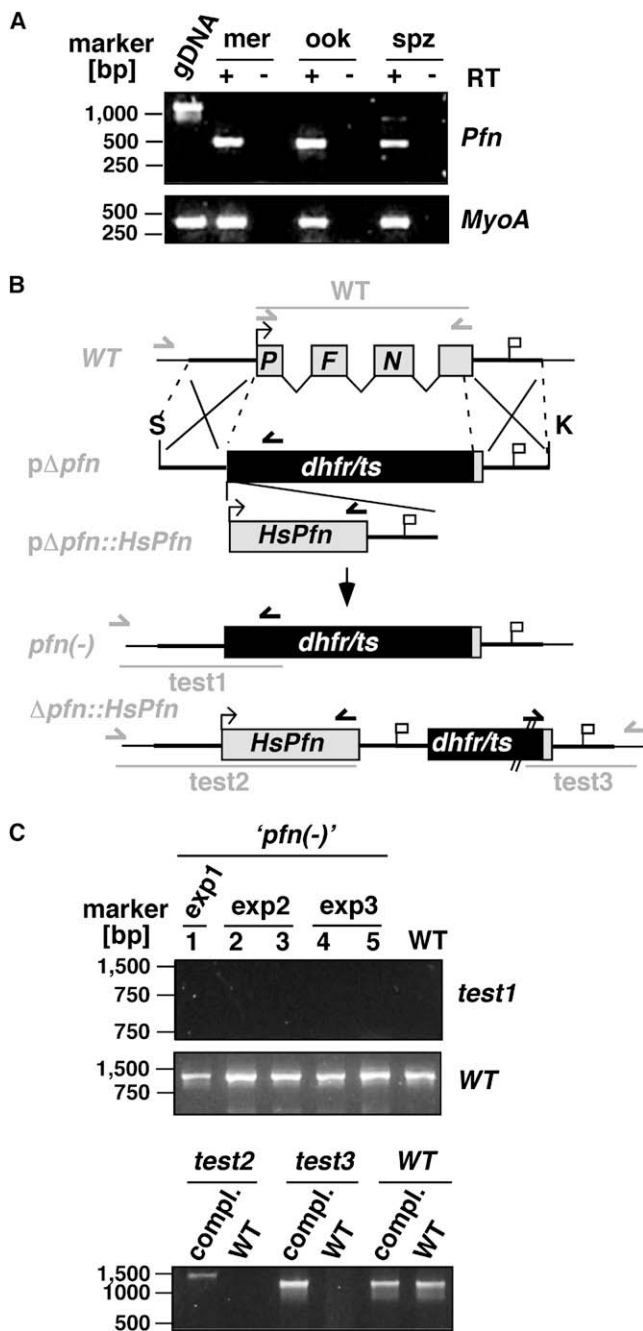


Figure 6. *Plasmodium berghei* Profilin Expression and Gene Targeting

(A) RT-PCR analysis of cDNAs from the three invasive stages of the parasite life cycle: merozoites (mer) that invade host erythrocytes, ookinets (ook) that penetrate the midgut epithelium of the mosquito vector, and sporozoites (spz) that invade the mammalian liver. The profilin gene contains three introns distinguishing PCR amplification from gDNA and cDNA. Transcripts of the myosin motor MyoA are included as a positive control. Pfn, profilin; RT, reverse transcriptase.

(B) Replacement strategy to generate a *pfn* loss-of-function [*pfn*(-)] mutant and a population that contains the orthologous human profilin cDNA under the control of parasite profilin regulatory sequences (Δ *pfn*::*HsPfn*) by double homologous recombination. The wild-type *Pfn* locus (WT) is targeted with a *Sac*II/*Kpn*I linearized fragment containing 5' and 3' flanking regions separated

peptide binding involves stacking and CH- π interactions in addition to direct hydrogen bonding, as in other profilin complexes with proline-rich peptides. Interestingly, the C-terminal helix of *Plasmodium* profilin does not participate in polyproline binding. In good agreement with our structural data, the positions corresponding to the important peptide binding residues of the C-terminal helix (His133 and Tyr139 in human profilin 1) are not conserved in *Plasmodium* species. This feature is shared with the mammalian profilin 3 isoform, which also lacks conserved aromatic residues in the C-terminal helix. In addition, the length of the C terminus in *Plasmodium* is not conserved, which may also reflect the lack of functionally important peptide binding residues in the helix and at the C terminus. Also, the unique N-terminal Tyr5 of *Plasmodium* profilins partly compensates for the lack of participation by the C-terminal helix. Together, our findings strongly suggest that the details of proline-rich peptide recognition differ between *Plasmodium* and other species, including other apicomplexan parasites. This could affect both specificity and affinity toward proline-rich sequences, and suggests adaptation to the physiological ligands. Indeed, the FH1 domains of *Plasmodium* formins 1 and 2 are divergent. In formin 1, the putative FH1 domain only contains a maximum of 2 consecutive prolines within a stretch of sequence that could bind to profilin. Recently, it has been shown that *P. falciparum* formin 1 does function in nucleating actin filaments (Baum et al., 2008). *Plasmodium* formin 2 has two stretches of 4 and 5 proline residues, respectively.

We have shown that *PfPfn* binds to actin, but that the actin binding residues are poorly conserved between *Plasmodium* and other organisms. Although many of the crucial interactions with actin are likely taken over by divergent *PfPfn* residues, others are completely missing, and it is possible that the different lengths of the β strands in the binding site result in a slight shift in the position of bound actin. The unique arm-like protrusion of *PfPfn* is positioned for interacting, via acidic side chains, with a positively charged patch on the actin surface, thereby compensating for the loss of other interactions at the actin binding site.

As previously described for other organisms, we could show that *Plasmodium* profilin performs a vital role for the propagation of the facultative intracellular parasite. *Plasmodium* profilin most likely fulfills the roles of conventional profilins, such as actin sequestering, binding to proline-rich sequences, and incorporating actin monomers into growing polymers. It is conceivable that additional functions mediated by parasite-specific residues and the unique minidomain found in the *PfPfn* structure operate at life cycle stages other than the pathogenic blood stages. A detailed experimental genetics approach is needed to dissect

by the positive selectable marker (*dhfr/ts*). Upon a double-crossover event this fragment is predicted to replace the endogenous *Pfn* copy. WT-specific (also used for the RT-PCR in panel A) and integration-specific PCR fragments are shown as lines and corresponding primers as arrows.

(C) Genotyping of the transfected parasite populations. Note the absence of integration-specific signals in the presence of WT-specific PCR reactions in case of the three independent profilin knockout attempts (upper panel). Genotyping of the Δ *pfn*::*HsPfn* parasite populations confirmed the predicted allelic replacement. Note that parasites were generated solely to demonstrate accessibility of the *PbPfn* locus to homologous recombination and functional complementation of the *PbPfn* gene by the corresponding *HsPfn-1* gene.

Table 1. Data Collection and Refinement Statistics

	Crystal form 1 (native, unliganded)	Crystal form 2 (native, liganded)	Crystal form 2 (MAD, liganded)		
Data collection					
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		
Cell dimensions					
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	45.44, 50.33, 86.65	45.52, 49.70, 83.81	45.28, 49.94, 86.22		
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90		
			<i>Peak</i>	<i>Inflection</i>	<i>Remote</i>
Wavelength (Å)	1.0	1.0	0.9193	0.9196	0.8856
Resolution (Å)	20–2.31 (2.37–2.31)	20–1.89 (1.94–1.89)	20–2.41 (2.55–2.41)	20–2.38 (2.53–2.38)	20–2.50 (2.65–2.50)
No. of reflections	8883 (556)	15675 (1001)	14385 (2169)	14991 (2259)	13019 (1958)
<i>R</i> _{sym} (%)	5.2 (19.7)	6.7 (61.1)	6.8 (16.2)	5.4 (16.3)	5.8 (19.7)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	25.0 (6.8)	14.6 (2.5)	24.9 (12.7)	18.2 (6.6)	20.5 (6.7)
Completeness (%)	96.4 (85.0)	98.7 (89.1)	98.8 (93.5)	98.8 (93.6)	98.9 (94.7)
Redundancy	6.4 (4.6)	5.9 (3.6)	9.2 (7.9)	3.7 (2.8)	4.6 (3.4)
Refinement					
Resolution (Å)	20–2.31	20–1.89			
No. of reflections	8436	14883			
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	20.0/26.9	17.6/21.7			
No. of atoms					
Protein	1337	1295			
Peptide	—	56			
Ion	—	1			
Water	83	100			
B-factors					
Protein	32.6	18.4			
Peptide	—	33.5			
Ion	—	18.9			
Water	38.2	27.3			
rms deviations					
Bond lengths (Å)	0.012	0.014			
Bond angles (°)	1.39	1.53			

Values in parentheses refer to the highest-resolution shell.

vital and auxiliary roles of profilin during *Plasmodium* life cycle progression.

In conclusion, despite its divergent sequence and structure, *Plasmodium* profilin can be classified as a true profilin. Its mode of proline-rich peptide binding is distinct, which is likely related to its binding specificity toward *Plasmodium*-specific ligands, such as the FH1 domains of *Plasmodium* formins. The unique properties of actin microfilaments and the restricted set of actin regulators in apicomplexan pathogens may require adjusted profilin functions. The novel minidomain described here may be related to such actin regulatory activities in the malaria parasite.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cloning and Protein Purification

Poly(A)⁺ RNA isolated from cultured *Plasmodium falciparum* strain HB3 mixed blood stages using oligo(dT) columns (Invitrogen) was used as a template for first-strand cDNA synthesis (Ambion). Human profilin-1 cDNA was a gift from Roger Karlsson. *PfPfn* and *HsPfn1* were amplified using sequence-specific

primers (sequences available on request) and subcloned into the *Bam*HI and *Xho*I sites of pET22b, and the *Nde*I and *Xho*I sites of pET28a (Novagen). Protein expression and purification were performed using standard protocols involving expression in *Escherichia coli* BL21(DE3) Codon Plus-RIPL cells (Stratagene), cell lysis using freeze-thaw cycles, lysozyme treatment, and sonication and purification on HisTrap HP columns (GE Healthcare). The hexahistidine affinity tag was cleaved, where applicable, using thrombin (GE Healthcare), and final purification was performed on a Sephadex S-200 gel filtration column (GE Healthcare). The pure protein was concentrated, flash-frozen in liquid N₂, and stored as aliquots at –80°C.

Protein Activity Assays

Human non-muscle β -actin (Cytoskeleton) (5 μ M) was induced to polymerize (1 mM MgCl₂ + 0.15 M KCl), and incubated at room temperature for 2–3 hr. After ultracentrifugation at 100,000 g at 20°C for 30 min in a Maxima centrifuge (Beckman Coulter), equal amounts of the supernatants and pellets were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining.

Poly(L)proline (Sigma P2129) was covalently linked to CNBr-activated sepharose 4B (GE Healthcare) (Lindberg et al., 1988). One hundred-microliter aliquots of a 50% suspension of polyproline sepharose in PBS were dispensed into reaction vials, and 5 nmol of different profilin proteins were added in a total volume of 150 μ l. After 15 min incubation at 20°C and three buffer washes, the

polyproline sepharose beads were collected by centrifugation, boiled in SDS-containing sample buffer, and analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining.

PIP strips (Echelon) were blocked with 3% fat-free skim milk in PBS and incubated with different profilin proteins at 20 $\mu\text{g/ml}$ for 1 hr at 20°C. After washing with PBS, membranes were incubated with mouse monoclonal anti-His6 antibody (Novagen 70796), goat anti-profilin-1 antibody (Santa Cruz Biotechnologies SC-18346), or rabbit antisera raised against purified recombinant *P. falciparum* profilin (Eurogentec). Primary antibodies were then detected using the ECL kit (GE Healthcare).

Protein Crystallization

For crystallization, purified PfPfn-His6 was extensively dialyzed against 10 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0). The peptides PPPPPPP (octaproline) and KKIPAPPPFLKK (Genemed Synthesis) were dissolved in the dialysis buffer. Then, an isothermal titration calorimetry experiment was carried out with each peptide being titrated into the profilin solution. For the octaproline peptide, the profilin concentration was 31 μM and the peptide 0.7 mM, and for the KKIPAPPPFLKK peptide, the concentrations were 62.5 μM and 1.4 mM, respectively. The titrations were run at 35°C (data not shown), and after the experiment, the samples were rescued and concentrated to approximately 10 mg/ml. Simultaneously, the buffer was exchanged to 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM DTT. The concentrated samples were then subjected to crystallization screens in sitting drop plates at room temperature, mixing 1 μl of both the protein and well solution.

Crystals were initially obtained from the sample containing the KKIPAPPPFLKK peptide, in 2.2 M ammonium sulfate, in the pH range 6–9 (crystal form 1). A crystal from pH 6 was used for data collection (see below). For the second sample, crystals were grown in 80% Tacsimate (Hampton Research), in the pH range 4.5–5.5 (crystal form 2).

Data Collection and Processing

X-ray diffraction data were collected at 100 K under a stream of gaseous nitrogen. No additional cryoprotectants were used. Native data (wavelength 1.0 Å) from crystal forms 1 and 2 were collected on beamline I911-3 at MAX-Lab (Lund, Sweden), and multiwavelength anomalous dispersion (MAD) data for crystal form 2 at beamline BW7A at EMBL-Hamburg/DESY (wavelengths: 0.9193 Å, peak; 0.9196 Å, inflection; 0.8856 Å, high-energy remote). For phasing, a crystal of crystal form 2 was soaked for 24 hr in a drop of well solution supplemented with 0.6 M NaBr before cryocooling, and a 3-wavelength MAD dataset was collected. All data were processed using XDS (Kabsch, 1993) and XDSi (Kursula, 2004). Crystal parameters and data processing statistics are presented in Table 1.

Structure Determination and Refinement

After extensive molecular replacement trials, the structure was determined using MAD from a bromide-soaked crystal of crystal form 2. F_o values were obtained using XPREP (Bruker-AXS Inc.) to 2.6 Å, enabling the bromide substructure to be solved (11 of 19 bromides) using the program SHELXD (Schneider and Sheldrick, 2002) and refined with BP3 (Pannu and Read, 2004). Initial MAD phases were extended to 2.4 Å and improved with statistical density modification using RESOLVE (Terwilliger, 2000), and model building was continued in ARP/wARP (Perrakis et al., 2001). At this stage, 60 out of 171 residues were built in 7 fragments. Another 20 residues were built manually. The partial model and peak dataset were used in the MRSAD protocol of Auto-Rickshaw (Panjikar et al., 2005). The software pipeline used the program CNS (Brunger et al., 1998) for rigid body, positional and B-factor refinement to 3.0 Å, and then further refinement to the maximum resolution using REFMAC5 (Murshudov et al., 1997). Dual fragment phasing was performed based on the partially refined model and the bromide sites from anomalous difference Fourier in the program OASIS (Yao et al., 2006). The bromide sites were refined using SHARP (Bricogne et al., 2003), and the resulting phases were combined with the phases obtained from OASIS using SIGMAA (Read, 1986) and further improved using RESOLVE. From the slightly improved phases, ARP/wARP was able to build 100 residues. Anomalous difference Fourier was repeated to find extra bromide peaks using phases derived from the ARP/wARP model. The above-described procedure (from OASIS to ARP/wARP) was repeated twice. Finally, ARP/wARP built 165 residues out of 171, and side chains of

155 residues were automatically docked. The final model resulting from the software pipeline was then used for manual building using the program COOT (Emsley and Cowtan, 2004), alternated with several cycles of TLS refinement (Winn et al., 2001) using the programs REFMAC5 and Phenix (Adams et al., 2002; Afonine et al., 2005), and the data from the peak wavelength. Using this refined structure, the structure of crystal form 1 was solved by molecular replacement. A higher-resolution structure of crystal form 2 was also solved from a crystal not soaked in bromide.

Despite the presence of a peptide in the crystallization condition for crystal form 1, no additional electron density was detected at the peptide-binding site. Therefore, this crystal form led to the unliganded structure of PfPfn. Crystal form 2, however, has the octaproline peptide bound at the conventional proline-rich-peptide binding site. The structures of crystal forms 1 and 2 were finally refined to R/R_{free} factors of 20.0/26.9 and 17.6/21.7, respectively, with good geometry (Table 1). In the Ramachandran plot for the apo structure, 98.5%, 1.5%, and 0% of the residues were in the allowed, additionally allowed, and disallowed regions, respectively. For the liganded structure, the distribution was 99.3%, 0.7%, and 0%, respectively.

Homology Modeling

Homology models of *P. falciparum* actin and TgPfn were constructed using SWISS-MODEL (Guex and Peitsch, 1997) based on sequence alignments with rabbit actin and PfPfn, respectively. Rabbit and *P. falciparum* actins are 82% identical, and TgPfn and PfPfn are 42% identical.

Reverse Genetics in *Plasmodium berghei*

For *Plasmodium* profilin expression pattern analysis, poly(A)⁺ RNA isolated from merozoites, ookinetes, and salivary gland sporozoites was used for cDNA synthesis and amplification followed by standard PCR amplification using gene-specific primers (all primer sequences available upon request).

Targeted disruption of PbPfn was performed as described previously (Janse et al., 2006; Thathy and Menard, 2002). Integration-specific PCR amplification of the *Pfn(-)* locus was generated using specific primer combinations. We repeatedly failed to obtain *Pfn(-)* parasites. A complementation plasmid containing the orthologous human profilin-1 gene under the control of the *PbPfn* promoter was transfected and selected for using the same method.

ACCESSION NUMBERS

Atomic coordinates and structure factors of PfPfn have been deposited in the Protein Data Bank under the accession codes 2JKF (apo structure) and 2JKG (peptide complex). The coding sequence of PbPfn has been submitted to GenBank under the accession code EU735101.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data include four figures and can be found with this article online at <http://www.structure.org/cgi/content/full/16/11/1638/DC1/>.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Roger Karlsson for the HsPfn1 cDNA and Taco Kooij for annotating *Plasmodium* profilin sequences. The excellent support by the beamline staff at EMBL Hamburg and MAX-Lab is gratefully acknowledged. This study was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHU1561/1-2) (H.S.), the Academy of Finland (I.K., P.K.), and the European Commission FP7 Marie Curie program (I.K.). Crystallographic data collection at EMBL Hamburg and MAX-Lab was supported by the European Community Research Infrastructure Action under the FP6 "Structuring the European Research Area" Programme (through the Integrated Infrastructure Initiative "Integrating Activity on Synchrotron and Free Electron Laser Science"), contract RII3-CT-2004-506008(IA-SFS).

Received: July 21, 2008

Revised: September 5, 2008

Accepted: September 5, 2008

Published: November 11, 2008

REFERENCES

- Adams, P.D., Grosse-Kunstleve, R.W., Hung, L.W., Ioerger, T.R., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Read, R.J., Sacchettini, J.C., Sauter, N.K., and Terwilliger, T.C. (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1948–1954.
- Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., and Adams, P.D. (2005). A robust bulk-solvent correction and anisotropic scaling procedure. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **61**, 850–855.
- Baum, J., Tonkin, C., Paul, A., Rug, M., Smith, B., Gould, S., Richard, D., Pollard, T.D., and Cowman, A. (2008). A malaria parasite formin regulates actin polymerization and localizes to the parasite-erythrocyte moving junction during invasion. *Cell Host Microbe* **3**, 188–198.
- Bergman, L.W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T.M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenzweig, V., and Kappe, S.H. (2003). Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *J. Cell Sci.* **116**, 39–49.
- Björkegren, C., Rozycki, M., Schutt, C.E., Lindberg, U., and Karlsson, R. (1993). Mutagenesis of human profilin locates its poly(L-proline)-binding site to a hydrophobic patch of aromatic amino acids. *FEBS Lett.* **333**, 123–126.
- Blasco, R., Cole, N., and Moss, B. (1991). Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein. *J. Virol.* **65**, 4598–4608.
- Bricogne, G., Vonrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M., and Paciorek, W. (2003). Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**, 2023–2030.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921.
- Carlsson, L., Nystrom, L.E., Sundkvist, I., Markey, F., and Lindberg, U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* **115**, 465–483.
- Chaudhary, A., Chen, J., Gu, Q.M., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., and Prestwich, G.D. (1998). Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I. *Chem. Biol.* **5**, 273–281.
- Eads, J.C., Mahoney, N.M., Vorobiev, S., Bresnick, A.R., Wen, K.K., Rubenstein, P.A., Haarer, B.K., and Almo, S.C. (1998). Structure determination and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* profilin. *Biochemistry* **37**, 11171–11181.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adams, N., Pringle, J.R., Peter, M., and Boone, C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* **276**, 118–122.
- Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S., and Dominguez, R. (2007). Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* **26**, 4597–4606.
- Field, S.J., Pinder, J.C., Clough, B., Dluzewski, A.R., Wilson, R.J., and Gratzler, W.B. (1993). Actin in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **25**, 43–48.
- Gonzalez, L.J., Jr., Weis, W.I., and Scheller, R.H. (2001). A novel snare N-terminal domain revealed by the crystal structure of Sec22b. *J. Biol. Chem.* **276**, 24203–24211.
- Gordon, J.L., and Sibley, L.D. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics* **6**, 179.
- Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723.
- Janse, C.J., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., van Gemert, G., Sauerwein, R.W., and Waters, A.P. (2006). High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol. Biochem. Parasitol.* **145**, 60–70.
- Jockusch, B.M., Murk, K., and Rothkegel, M. (2007). The profile of profilins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **159**, 131–149.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800.
- Korenbaum, E., Nordberg, P., Björkegren-Sjogren, C., Schutt, C.E., Lindberg, U., and Karlsson, R. (1998). The role of profilin in actin polymerization and nucleotide exchange. *Biochemistry* **37**, 9274–9283.
- Kursula, P. (2004). XDSi: a graphical interface for the data processing program XDS. *J. Appl. Crystallogr.* **37**, 347–348.
- Kursula, P., Kursula, I., Massimi, M., Song, Y., Downer, J., Stanley, W., Witke, W., and Wilmanns, M. (2008). High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex formation with two physiological ligands: the formin homology 1 domain of mDia1 and the proline-rich domain of VASP. *J. Mol. Biol.* **375**, 270–290.
- Lambrechts, A., Jonckheere, V., Dewitte, D., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (2002). Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochem.* **3**, 12.
- Lindberg, U., Schutt, C.E., Hellsten, E., Tjader, A.C., and Hult, T. (1988). The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **967**, 391–400.
- Loisel, T.P., Boujema, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**, 613–616.
- Lu, P.J., Shieh, W.R., Rhee, S.G., Yin, H.L., and Chen, C.S. (1996). Lipid products of phosphoinositide 3-kinase bind human profilin with high affinity. *Biochemistry* **35**, 14027–14034.
- Machesky, L.M., Cole, N.B., Moss, B., and Pollard, T.D. (1994). *Vaccinia* virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry* **33**, 10815–10824.
- Mahoney, N.M., Janmey, P.A., and Almo, S.C. (1997). Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 953–960.
- Murshudov, G.N., Vagin, A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255.
- Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V.S., Weiss, M.S., and Tucker, P.A. (2005). Auto-Rickshaw: an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **61**, 449–457.
- Pannu, N.S., and Read, R.J. (2004). The application of multivariate statistical techniques improves single-wavelength anomalous diffraction phasing. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 22–27.
- Perrakis, A., Harkiolaki, M., Wilson, K.S., and Lamzin, V.S. (2001). ARP/wARP and molecular replacement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 1445–1450.
- Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M.F., Sher, A., and Soldati-Favre, D. (2008). *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* **3**, 77–87.
- Qian, C., Zhang, Q., Wang, X., Zeng, L., Farooq, A., and Zhou, M. (2005). Structure of the adaptor protein p14 reveals a profilin-like fold with distinct function. *J. Mol. Biol.* **347**, 309–321.
- Read, R.J. (1986). Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallogr. A Found. Crystallogr.* **42**, 140–149.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**, 419–429.

- Russell, D.G., and Sinden, R.E. (1981). The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J. Cell Sci.* *50*, 345–359.
- Sahoo, N., Beatty, W., Heuser, J., Sept, D., and Sibley, L.D. (2006). Unusual kinetic and structural properties control rapid assembly and turnover of actin in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell* *17*, 895–906.
- Schlüter, K., Schleicher, M., and Jockusch, B.M. (1998). Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I. *J. Cell Sci.* *111*, 3261–3273.
- Schmitz, S., Grainger, M., Howell, S., Calder, L., Gaeb, M., Pinder, J., Holder, A., and Veigel, C. (2005). Malaria parasite actin filaments are very short. *J. Mol. Biol.* *349*, 113–125.
- Schneider, T.R., and Sheldrick, G.M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *58*, 1772–1779.
- Schüler, H., and Matuschewski, K. (2006). Regulation of apicomplexan microfilament dynamics by a minimal set of actin-binding proteins. *Traffic* *7*, 1433–1439.
- Schüler, H., Mueller, A.K., and Matuschewski, K. (2005). Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS Lett.* *579*, 655–660.
- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C., and Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* *365*, 810–816.
- Skare, P., and Karlsson, R. (2002). Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett.* *522*, 119–124.
- Sohn, R.H., Chen, J., Koblan, K.S., Bray, P.F., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1995). Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin. *J. Biol. Chem.* *270*, 21114–21120.
- Soldati, D., and Meissner, M. (2004). *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 32–40.
- Tanaka, M., and Shibata, H. (1985). Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur. J. Biochem.* *151*, 291–297.
- Terwilliger, T.C. (2000). Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *56*, 965–972.
- Thathy, V., and Menard, R. (2002). Gene targeting in *Plasmodium berghei*. *Methods Mol. Med.* *72*, 317–331.
- Thorn, K.S., Christensen, H.E., Shigeta, R., Huddler, D., Shalaby, L., Lindberg, U., Chua, N.H., and Schutt, C.E. (1997). The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure* *5*, 19–32.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* *16*, 3044–3056.
- Winn, M.D., Isupov, M.N., and Murshudov, G.N. (2001). Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *57*, 122–133.
- Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* *14*, 461–469.
- Yao, D.Q., Huang, S., Wang, J.W., Gu, Y.X., Zheng, C.D., Fan, H.F., Watanabe, N., and Tanaka, I. (2006). SAD phasing by OASIS-2004: case studies of dual-space fragment extension. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *62*, 883–890.