

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplombiologe Sebastiano Bellanca
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: _____

**Molekularbiologisch-biochemische Untersuchungen
des *Plasmodium falciparum* Chloroquin Resistenz
Transporters mittels Expression in *Xenopus laevis*
Oozyten**

Gutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer
Dr. Ann-Kristin Mueller

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig unter Anleitung verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Des weiteren erkläre ich hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Infektiologie, Abteilung Parasitologie des Universitätsklinikum Heidelberg in der Zeit von Oktober 2008 bis Juli 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Lanzer durchgeführt.

Datum

Sebastiano Bellanca

Danksagung

Zuerst einmal möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Lanzer für die Übertragung des Themas und für die Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass ich das Thema selbständige und frei entwickeln konnte.

Bei Dr. Ann-Kristin Mueller möchte ich mich ganz herzlich für die bereitwillige und spontane Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Auch bei Prof. Dr. Stephan Frings möchte ich mich für sein Interesse an meiner Arbeit bedanken. Er war stetes Mitglied in meinen TAC-Meetings und ist weiterhin Teil meines Prüfungskomitees.

Ein besonderer Dank auch an Prof. Dr. Andreas Draguhn, der sich bedenkenlos bereiterklärte, an meiner Prüfung teilzunehmen.

Ich will ich mich auch bei Dr. Andreas Schäfer bedanken. Zum einen, dass er sich ohne Bedenken bereiterklärt hatte, an meiner Prüfung teilzunehmen, verständliche Gründe jedoch in Form von mehreren Flugstunden dazwischen kamen und zum anderen für die gute Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren.

An dieser Stelle will ich mich auch bei PD. Dr. Marcel Deponte für die kompetente Diskussion und Unterstützung bedanken. Dies war stets sehr hilfreich und hat grundlegend zu meinem Verständnis für enzymkinetische Gesetzmäßigkeiten beigetragen.

Natürlich will ich mich auch bei Prof. Dr. Wilfred Stein für seinen intellektuellen Beitrag bedanken, wodurch viele neue Sichtweisen eröffnet werden konnten.

Ich will mich auch bei der ganzen AG Lanzer – Cecilia Sanchez, Marek Cyrklaff, Sonia Moliner, Martin Dittmer, Marina Müller, Stefan Prior, Maximilian Nick, Harden Rieger, Gabriel Liu, Carine Djuika, Ines Petersen, Nicole Kilian, Eike Pfefferkorn, Carolin Geiger, Hani Kartini Agustar, Isabel Bousonville, Sophia Deil, Katharina Ehrhardt, Anurag Dave, Sirikamol 'Nick' Srismith und natürlich auch Miriam Griesheimer und Alessia Valdarno – für die Hilfsbereitschaft, die gute Zeit und für das entspannte und angenehme Arbeitsklima bedanken. Besonders bei Anurag Dave und

Martin Dittmer will ich mich an dieser Stelle nochmals für die fortwährende Diskussion meiner Ergebnisse und die Unterstützung bedanken.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden Barbara Halász Živković, Christian Halász und Vito Damiano sowie bei Gabor und Paola Halász bedanken. Deren Unterstützung und ermutigenden Worte ließen zu keiner Zeit Zweifel am Gelingen dieser Arbeit aufkommen. Insbesondere Gabor Halász möchte ich für das abschließende Korrekturlesen danken, wodurch ich ruhigen Gewissens die Arbeit zum Druck geben konnte.

Meiner ganzen Familie möchte ich von Herzen dafür danken, dass sie mich stets ermutigt und unterstützt hat. Besonders meinen Eltern, meiner Mutter Nunzia Bellanca und meinem Vater Mariano Bellanca, möchte ich dafür danken, dass sie mir in jeder Lebenslage ermutigend zur Seite gestanden haben. Meinem Vater vor allem dafür, dass er mir immer den Rücken freigehalten hat, so dass ich mich auf diese Arbeit konzentrieren konnte.

Bei meiner kleinen Tochter Laetitia möchte ich mich für die erheiternde Zeit, für ihr Interesse und für ihr Verständnis bedanken, welches sie trotz ihres jungen Alters für mich aufgebracht hat. Auch bei meinem großen Mädchen Melissa möchte ich mich bedanken, einfach dafür, dass sie da ist.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Alanin bzw. Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
App.	Apparent
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	Beziehungsweise
C	Cystein bzw Cytosin
ca.	circa
cds	coding sequence (kodierende Sequenz)
CIDR	cysteinrich interdomaine region
CLT	CRT like transporter
cpm	counts per minute (Zählungen pro Minute)
CQ	Chloroquin
CQR	Chloroquinresistent bzw. Chloroquinresistenz
CQS	Chloroquin sensitiv
CR1	Complement-Rezeptor 1
cRNA	coding RNA (kodierende RNA)
CSA	Chondroitin-4-sulfat
D	Asparaginsäure
d. h.	das heißt
DBL	duffy binding like
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DHPS	Dihydropteroat-Synthase
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribose Nucleinsäure)
dTMP	desoxy-Thymidinmonophosphat
E	Glutaminsäure
<i>E. coli.</i>	<i>Escherichia coli</i>
F	Phenylalanin
FPIX	Ferriprotoporphyrin IX
G	Glycin bzw. Guanin
GFP	green fluorescent protein
H	Histidin
h	hour (Stunde)
I	Isoleucin
IBF	Interfakultären Biomedizinischen Forschungszentrums
IC ₅₀	inhibitory concentration (mittlere inhibitorische Konzentration)
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
Jhd.	Jahrhundert
K	Lysin
kDa	Kilo Dalton
L	Leucin
M	Methionin
MCS	multiple cloning site (multiple Klonierungsstelle)
mdr	multiple drug resistance
Mio.	Million(en)
Mrd.	Milliarde(n)

MSP1	merozoite surface protein 1
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
N	Asparagin bzw. Stickstoff
NPPs	new permeation pathways
ns	nicht significant
NV	Nahrungsvakuole
OD	optische Dichte
OR2	oocyte ringer solution 2
P	Prolin
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PCR	polymerasechain reaction (Polymeraseketteneaktion)
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
PfEMP1	<i>P. falciparum</i> erythrozyte membrane protein 1
PfKARHP1	<i>P. falciparum</i> knob associated histidine rich protein 1
PfMDR1	<i>Plasmodium falciparum</i> multidrug resistant transporter 1
PfNHE1	<i>Plasmodium falciparum</i> sodium proton exchanger
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVM	parasitophore Vakuolen-Membran
Q	Glutamin
QD	Chinidin
QN	Chinin
R	Arginin
RIFIN	repetitive intersped family
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis
STEVOR	subtelomeric variable open reading frames
T	Threonin bzw. Thymin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofolsäure
TMD	Transmembrandomäne
U	unit (Einheit)
üN	über Nacht
V	Valin
v. Chr.	vor Christus
VCAM-1	vascular cellular adhesion molecule 1
VP	Verapamil
W	Tryptophan
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Y	Tyrosin
α	anti

Inhaltsübersicht

Danksagung	I
Abkürzungen	III
Inhaltsübersicht	V
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Malaria	5
1.2. Historischer Hintergrund.....	7
1.3. Der Malaria-Erreger <i>Plasmodium falciparum</i>	8
1.3.1. Biologie und Lebenszyklus	8
1.3.2. Das Krankheitsbild.....	10
1.4. Strukturelle Veränderungen des Erythrozyten nach Infektion durch <i>P. falciparum</i>	11
1.5. Bekämpfung der Malaria.....	15
1.6. Anti-Malaria Wirkstoffe.....	16
1.6.1. Antifolate.....	17
1.6.2. Hemmstoffe der Atmungskette	18
1.6.3. Antibiotika.....	19
1.6.4. Artemisinin-Derivate	20
1.6.5. Aminochinoline und Arylaminoalkohole.....	21
1.6.6. Entwicklung neuer Wirkstoffe	22
1.7. Wirk- und Resistenzmechanismen von Chloroquin und Chinin.....	23
1.7.1. Wirkmechanismus von CQ und QN.....	23
1.7.2. CQ- und QN-Resistenz in <i>P. falciparum</i>	25
1.8. PfCRT.....	27
1.9. <i>Xenopus laevis</i> Oozyten als heterologes Expressionssystem	30
1.10. Zielsetzung der Arbeit.....	32
2. Material und Methoden.....	33
2.1. Material	33
2.1.1. Laborausstattung	33
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	34
2.1.3. Chemikalien	35
2.1.3.1. Allgemeine Chemikalien.....	35
2.1.3.2. Radioaktiv markierte Chemikalien.....	35
2.1.4. Puffer, Medien und Lösungen.....	35
2.1.5. Molekularbiologische Kits	39
2.1.6. Enzyme.....	39
2.1.7. Größenmarker und Ladepuffer.....	39
2.1.8. Oligonukleotide.....	39
2.1.9. Vektoren.....	39
2.1.10. Bakterienstämme.....	41
2.1.11. Antikörper	41

2.1.12.	Tierstämme und Oozyten	41
2.1.13.	Software	41
2.2.	Methoden.....	42
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden.....	42
2.2.1.1.	Elektrophorese von DNA und RNA in Agarosegelen	42
2.2.1.2.	DNA-Extraktion	43
2.2.1.3.	<i>In vitro</i> -Synthese von cRNA	44
2.2.1.4.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	45
2.2.1.5.	Polymeraseketteneaktion (PCR)	45
2.2.1.6.	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	46
2.2.1.7.	Ligation	47
2.2.2.	Mikrobiologische Methoden	48
2.2.2.1.	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	48
2.2.2.2.	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	48
2.2.2.3.	Plattenkulturen von <i>E. coli</i> -Bakterien	49
2.2.2.4.	Flüssigkulturen von <i>E. coli</i> -Bakterien.....	49
2.2.2.5.	Überprüfung der Transformationen	49
2.2.3.	Proteinbiochemische Methoden	50
2.2.3.1.	Gesamt-Protein Aufreinigung aus <i>X. laevis</i> Oozyten	50
2.2.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.2.3.3.	Coomassie Anfärbung von Proteinen.....	51
2.2.3.4.	Western Blot.....	51
2.2.3.5.	Abwaschen von Antikörpern auf Polyvinylidifluorid Membranen.....	52
2.2.4.	Umgang mit <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	52
2.2.4.1.	Umgang mit den Fröschen und Gewinnung und Behandlung der Oozyten.....	52
2.2.4.2.	Injektion von cRNA in die Oozyten.....	54
2.2.4.3.	Inkubation der Oozyten.....	54
2.2.4.4.	Transportstudien mit Oozyten und Messung der Radioaktivität.....	55
2.2.5.	Auswertung, Berechnungen und statistische Analysen.....	55
3.	Ergebnisse	56
3.1.	Messung des Transports von CQ, QN und QD mit Oozyten von <i>X. laevis</i> zur Validierung des Expressionssystems	56
3.2.	Untersuchung zu den Substratbindetaschen für CQ und QN in PfCRT ^{Dd2}	60
3.2.1.	QN inhibiert den PfCRT ^{Dd2} vermittelten Transport von CQ	60
3.2.2.	Ebenso inhibiert CQ den PfCRT ^{Dd2} vermittelten Transport von QN.....	63
3.3.	Untersuchung der Aminosäure an Position 76 in PfCRT	66
3.3.1.	Transport von CQ, QN und QD durch PfCRT Dd2 ^{T76X}	66
3.3.2.	Einfluß von Mutationen in T76 auf die Transportkinetik von PfCRT ^{Dd2}	69
3.4.	Rückmutationen spezifischer Aminosäuren in PfCRT verändern dessen Transporteigenschaften für CQ, QN und QD.....	72
3.4.1.	Aufnahme von CQ, QN und QD durch PfCRT ^{GB4} Varianten.....	72
3.4.2.	Aufnahme von CQ, QN und QD durch PfCRT ^{Ecu1110} Varianten	74
3.4.3.	Aufnahme von CQ, QN und QD durch chimäre PfCRT Varianten.....	76
3.4.4.	PfCRT ^{Ecu1110} interagiert nicht mit QN.....	79
3.4.5.	Gesamtüberblick über die Auswirkung von Mutationen in PfCRT	80
3.5.	Nachweis der Expression von PfCRT in Oozyten	83

4.	Diskussion	85
4.1.	Bindemechanismus von PfCRT für CQ und QN	85
4.2.	Bedeutung der mutierten Aminosäuren für Bindung und Transport der Substrate.....	89
4.2.1.	Bedeutung der Aminosäure 76	89
4.2.2.	Bedeutung der übrigen sieben mutierten Aminosäuren	92
4.3.	Bedeutung dieser Arbeit für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria.....	95
5.	Ausblick	96
6.	Referenzen	97
7.	Anhang	110
7.1.	Aminosäure- und DNA-Sequenzen.....	110
7.1.1.	PfCRT ^{HB3}	110
7.1.2.	PfCRT ^{Dd2}	111
7.1.3.	PfCRT ^{GB4}	112
7.1.4.	PfCRT ^{Ecu1110}	113
7.2.	Verwendete Oligonukleotide.....	114

Zusammenfassung

Malaria ist mit einer Mortalitätsrate von über einer Million Menschen pro Jahr, wovon die meisten Kinder unter fünf Jahren sind, nach wie vor eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Aufgrund der sich immer weiter ausbreitenden Resistenzen des Erregers *Plasmodium falciparum* gegen Malaria-Medikamente wird der Kampf gegen die Krankheit zunehmend schwerer. Das einstmals mit hoher Effizienz und geringen Nebenwirkungen einsetzbare Chloroquin (CQ) beispielsweise verlor in den vergangenen Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung. Ebenso verhält es sich für Chinin (QN). Wie aber kommt es zur Ausbildung dieser Resistenzen?

Das in der Nahrungsvakuole des Parasiten lokalisierte transmembrane Protein PfCRT (*Plasmodium falciparum* Chloroquin Resistenz Transporter) spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Punktmutationen innerhalb dieses Proteins zu einem gesteigerten Efflux von CQ aus der Nahrungsvakuole herausführen. Die Schlüsselrolle hierbei kommt der Aminosäure an Position 76 zu. Beim CQ sensitiven *Plasmodium falciparum* Stamm HB3 befindet sich an dieser Position ein Lysin (K76), wohingegen beim CQ resistenten Stamm Dd2 ein Threonin (T⁷⁶) an dieser Stelle festzustellen ist. Darüber hinaus gibt es noch weitere Polymorphismen in PfCRT, welche Einfluss auf dessen Funktionalität nehmen.

CQ und QN sind Substrate von PfCRT. Ob die Substratbindetasche in PfCRT für CQ und QN dieselbe ist, ob sie teilweise überlappt oder ob jedes Substrat in einer eigenständigen Bindetasche bindet ist noch unklar. Um dies zu untersuchen, wurde PfCRT^{Dd2} in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert, welche anschließend für Aufnahmestudien mit CQ und QN verwendet wurden. Zunächst wurden konzentrationsabhängige Aufnahmestudien mit CQ unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von QN durchgeführt. Anschließend wurden die Versuchsbedingungen umgekehrt und die konzentrationsabhängige Aufnahme von QN bei verschiedenen Konzentrationen von CQ gemessen. Die in diesen Versuchen erzielten Ergebnisse sprechen für eine partiell gemischte (hyperbolische) Inhibierung, was wiederum auf unterschiedliche Bindetasche für das jeweilige Substrat hindeutet.

Um zu untersuchen, wie sich Mutationen an der bedeutenden Position 76 auf die Transporteigenschaften von PfCRT auswirken, wurde T76 in PfCRT^{Dd2} jeweils durch die 19 restlichen proteinogenen Aminosäuren ersetzt (T76X) und ebenfalls in Oozyten von *X. laevis* exprimiert. Die im Anschluss in den Oozyten gemessene Aufnahme von CQ, QN und dessen

Isomers Chinidin (QD) zeigt, dass Aminosäuren mit positiv geladener Seitenkette (Lysin, Arginin und Histidin) an Position 76 die entsprechende PfCRT vermittelte Akkumulation aller drei Substrate unterbinden. Diese Akkumulation wird auch durch die Substitution von T76 durch Prolin (T76P) unterbunden. Allerdings ist der Effekt hier sehr wahrscheinlich auf die cyclische Form der Seitenkette des Prolins zurückzuführen (→ „Helixbrecher“). Anhand einer Auswahl von PfCRT Dd2^{T76X} Varianten ließ sich ebenfalls durch Aufnahmestudien mit CQ in *X. laevis* Oozyten ein direkter Einfluss auf die Transportkinetik von PfCRT^{Dd2} nachweisen.

Durch gezielte Mutagenese wurde weiterhin eine Reihe von PfCRT Varianten mit Mutationen an spezifischen Positionen in Oozyten exprimiert und ebenfalls für Aufnahmestudien verwendet. Die Intention dahinter war, den Einfluss der mutierten Aminosäuren auf die Funktionalität von PfCRT zu prüfen. Die daraus erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass außer T76 noch weitere Aminosäuren eine mehr oder weniger wichtige Rolle für den Substrattransport spielen. Vor allem E75 hat einen entscheidenden Einfluss auf den Transport, insbesondere für QN und QD. Außerdem wirken sich verschiedene Kombinationen von Mutationen in PfCRT auf die Aufnahmerate und Substratspezifität aus, was durch einen weiteren Wettbewerbsversuch mit QN und CQ bestätigt werden konnte. In diesem Versuch wurden die PfCRT Variante des *P. falciparum* Stammes Ecu1110 und eine chimäre PfCRT Variante (die erste Hälfte des Proteins von PfCRT^{Dd2} und die zweite Hälfte von PfCRT^{Ecu1110}) mit PfCRT^{Dd2} bezüglich der CQ Aufnahme in Anwesenheit von QN verglichen.

Basierend auf diese Daten wurden Zusammenhänge zwischen Mutationen in PfCRT und damit einhergehende Veränderungen in dessen Transportaktivität beobachtet und in einem Gesamtkontext veranschaulicht.

Summary

With a mortality rate of more than one million people a year, of whom most are children under five years, Malaria remains one of the most important infectious diseases in the world. Due to the always further expanding resistances of the pathogen *Plasmodium falciparum* against antimalarial drugs the fight against the disease becomes more severe. Chloroquine (CQ) for example, which used to be highly efficient with low side effects, lost over the past decades more and more importance. The same is true for quinine (QN). But how do these resistances form?

The transmembrane protein PfCRT (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter), which is localized in the digestive vacuole of the parasite, plays a decisive role in that context. It has been shown, that certain point mutations within this protein lead to an increased efflux of CQ out of the food vacuole. The key role for that plays the amino acid at position 76. In the CQ-sensitive *Plasmodium falciparum* strain HB3, at this position there is located a lysine (K76) whereas in the CQ resistant strain Dd2 a threonine (T76) can be found at this position. Moreover, there are other polymorphisms in PfCRT, which have an effect on its functionality.

CQ and QN are substrates of PfCRT. Whether the substrate binding pocket in PfCRT for CQ and QN is the same, whether they are partially overlapping or whether each substrate binds in a separate binding site, is not clear yet. To investigate this, PfCRT^{Dd2} was expressed in *Xenopus laevis* oocytes, which subsequently were used for uptake studies with CQ and QN. First concentration dependent uptake studies were performed with CQ with addition of various concentrations of QN. Subsequently, the experimental conditions were inverted and the concentration dependent uptake of QN was measured in addition of various concentrations of CQ. The results obtained in these experiments indicate a partially mixed (hyperbolic) inhibition, which again suggest different binding sites for both substrates.

To examine how mutations at the crucial position 76 impact on the transport properties of PfCRT, T76 in PfCRT^{Dd2} was replaced in each case by the 19 remaining proteinogenic amino acids (T76X) and also expressed in oocytes of *X. laevis*. The subsequently measured uptake of CQ, QN and its isomer quinidine (QD) in oocytes showed, that amino acids with positively charged side chain (lysine, arginine and histidine) at position 76 prevent the corresponding PfCRT mediated accumulation of all three substrates. This uptake is also prevented by the substitution of T76 by proline (T76P). In this case, however, this is very likely due to the

cyclic form of the side chain of the proline (→ "helix breaker"). Based on a selection of PfCRT Dd2^{T76X} variants a direct impact on the transport kinetics of PfCRT^{Dd2} could be shown also by uptake studies with CQ in *X. laevis* oocytes.

By site directed mutagenesis still a number of PfCRT variants with mutations at specific positions were expressed in oocytes, which also were used for uptake studies. The intention behind this was to investigate the effect of the mutated amino acids on the functionality of PfCRT. The obtained results show, that apart of T76, also other amino acids play an important role for the substrate transport. E75 particularly plays an important role for the transport, in particular for QN and QD. Additionally, different combinations of mutations in PfCRT have an effect on the uptake rate and substrate specificity, which could be supported by an additional competition experiment with QN and CQ. In this experiment the PfCRT variant of the *P. falciparum* strain Ecu1110 and a chimeric PfCRT variant (the first half of the protein from PfCRT^{Dd2} and the second half from PfCRT^{Ecu1110}) were compared with PfCRT^{Dd2} in terms of CQ uptake in presence of QN.

Based on these data, connections between mutations in PfCRT and differences in its transport activity associated with that were observed and shown in a contextual overview

1. Einleitung

1.1. Malaria

Der Begriff Malaria stammt aus dem italienischen (“mal’ aria“) und bedeutet “schlechte Luft“. Dies ist auf die so genannte Miasmentheorie zurückzuführen, die besagt, dass übelriechende Gase in Sumpfgebieten für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich seien (Mehlhorn & Piekarski, 2002, Tuteja, 2007, Retief & Cilliers, 2006). Heute jedoch weiß man, dass die Krankheit durch Infektion mit dem einzelligen Parasiten der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen wird (Stamm: *Alveolata*, Unterstamm: *Apicomplexa*, Klasse: *Haematozoa*, Ordnung: *Haemosporida*, Familie: *Plasmodiidae*, Gattung: *Plasmodium* (Lucius & Loos-Frank, 1997)), welcher durch den Stich der weiblichen *Anopheles* Mücke übertragen wird (Mehlhorn & Piekarski, 2002). Gegenwärtig sind etwa 120 verschiedene Arten von *Plasmodium* beschrieben, deren spezifische Wirte unter den Vertebraten bei Reptilien, Vögel und Säugetiere zu finden sind. Beim Menschen lösen fünf *Plasmodium*-Arten Malaria aus (Tabelle 1.1.): *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica), *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* (Malaria tertiana) und *Plasmodium malariae* (Malaria quartana) (Greenwood *et al.*, 2005). Die fünfte Art, *Plasmodium knowlesi*, verursacht primär eine Erkrankung bei Affen, kann aber auch beim Menschen, hauptsächlich in Malaysia, zur Erkrankung mit ernsthaften Komplikationen führen (Singh *et al.*, 2004). Die von *P. falciparum* hervorgerufene bedrohlichste Form der Krankheit Malaria tropica (Greenwood *et al.*, 2005) kann bei fehlender oder zu später Behandlung zum Tod führen (Robert-Koch-Institut, 2010).

Tabelle 1.1.: Die humanpathogenen Malariaerreger

Fast alle Todesfälle und schweren Krankheitsverläufe werden durch *P. falciparum* verursacht. Er bildet Proteine auf seinen Wirtszellen aus, welche an das Endothel des Wirtes binden (Stich, 2009). Eine Infektion mit *P. knowlesi* kann für den Menschen ebenfalls tödlich sein. Fieberschübe treten hier typischerweise täglich auf. Ob mit *P. knowlesi* befallene Erythrozyten ebenfalls an Rezeptoren auf dem Endothel anhaften, ist nicht bekannt.

Art	Malariatyp	Zyklen der Fieberschübe [h]	Inkubation [Tage]	Maximale Parasitämie	Mortalität
<i>P. falciparum</i>	M. tropica	36 - 48	7 - 20	~20 %	+
<i>P. vivax</i>	M. tertiana	48	7 - 20	~ 2 %	-
<i>P. ovale</i>	M. tertiana	48	7 - 20	~ 2 %	+/-
<i>P. malariae</i>	M. quartana	72	15 - 20	>1 %	+/-

Eine fünfte Art, *P. knowlesi*, verursacht primär eine Erkrankung bei Affen und spielt lokal in Südostasien eine begrenzte Rolle. Diese Art ist erst seit den 30iger Jahren des letzten Jahrhunderts als humanpathogen bekannt.

Malaria ist trotz intensiver Forschungsarbeit nach wie vor eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten weltweit. Sie tritt in tropischen und subtropischen Regionen aller Kontinente mit Ausnahme von Australien auf. Etwa 3,3 Mrd. Menschen leben in Gebieten mit erhöhtem Malariarisiko (WHO, 2011). Nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) gab es im Jahre 2010 schätzungsweise 216 Mio. Erkrankungen, wovon 91 % durch *P. falciparum* verursacht wurden. 81 % aller Fälle ereigneten sich in Afrika, 13 % in Südostasien und die restlichen in den östlichen Mittelmeer-Regionen (WHO, 2011). Weltweit sind 2010 nach Schätzungen der WHO 660 Mio. Menschen an Malaria gestorben, davon über 90 % in Afrika, 6 % in Südostasien und 3 % in den östlichen Mittelmeer-Regionen (WHO, 2011, WHO, 2012). 86 % aller Todesfälle betrifft Kinder unter 5 Jahren (WHO, 2011, WHO, 2012), da diese noch keine Immunität erwerben konnten (Hviid, 2005, Hviid & Staalsoe, 2004). In Deutschland erkrankten nach Angaben des Robert-Koch-Instituts jährlich 800 bis 1000 Menschen an Malaria, wovon 5 an der Krankheit sterben (Robert-Koch-Institut, 2010). Seit Mitte des letzten Jahrhunderts gilt die Krankheit in Europa als ausgerottet. Abbildung 1.1. zeigt die globale Verbreitung der Malaria.



Abbildung 1.1.: Globale Verbreitung der Malaria (Stand: 2010)

Die Malaria ist vor allem in den tropischen und subtropischen Regionen Mittel- und Südamerikas, Afrikas und Asiens endemisch (Quelle: WHO).

Malaria kann durch die mit der Krankheit einhergehenden Abwesenheit in der Schule und die herabgesetzte Produktivität bei der Arbeit großen Einfluss auf intellektuelle und volkswirtschaftliche Entwicklung ausüben. Schätzungen zufolge ist in den vergangenen 35 Jahren das jährliche Bruttonationaleinkommen in Ländern, die stark von Malaria betroffen sind, um 2 % weniger angestiegen, als in vergleichbaren Ländern ohne Einfluss von Malaria (Greenwood *et al.*, 2005). Die von der Malaria verursachten Kosten für Afrika belaufen sich auf etwa 12 Mrd. Dollar pro Jahr, wodurch die ökonomische Entwicklung des jeweils betroffenen Landes grundlegend beeinträchtigt wird (Gallup & Sachs, 2001, Greenwood *et al.*, 2005).

1.2. Historischer Hintergrund

Malaria reicht sehr weit in die Geschichte zurück. Erste Beschreibungen der Krankheit stützen sich auf chinesische Schriftstücke von etwa 2700 v. Chr. (Cox, 2010, Scotto, 2010). Auch Darstellungen auf Tontafeln aus Mesopotamien von 2000 v. Chr., ägyptische Papyrusrollen von 1570 v. Chr. und indische Texte, die bis in das 6. Jhd. v. Chr. zurückreichen, lassen auf das Krankheitsbild der Malaria schließen. Solcherlei historische Dokumente müssen allerdings kritisch betrachtet werden. Überlieferungen aus der Antike – Homer um 850 v. Chr., Empedocles von Agrigentum um 550 v. Chr. und Hippokrates um etwa 400 v. Chr. – bringen etwas Licht in das Dunkel (Retief & Cilliers, 2006). Sie dokumentieren die typischen Anzeichen der Krankheit, wie zyklisch wiederkehrende Fieberschübe und vergrößerte Milz bei in Sumpfgebieten lebenden Menschen. Dadurch entstand der in Abschnitt 1.1. bereits erwähnte Irrglaube, dass die schlechte Luft in diesen Gebieten für die Krankheit ursächlich sei (Neghina *et al.*, 2010). Erst mit der Entdeckung der Bakterien durch Antoni van Leeuwenhoek im Jahre 1676 und der Vermutung, dass Mikroorganismen Ursache von Infektionskrankheiten sind, begann er zu schwinden (Cox, 2010). Nachdem Louis Pasteur und Robert Koch 1878/1879 die Keimtheorie entwickelten, die besagt, dass Krankheiten durch Mikroorganismen verursacht werden, verstärkte sich die Suche nach der tatsächlichen Ursache für Malaria. Im Jahre 1880 entdeckte Charles Louis Alphonse Laveran den Erreger *Plasmodium* im Blut von Malaria-Patienten, und 1897 identifizierte Ronald Ross Stechmücken der Art *Anopheles* als Überträger von Vogel malaria (Cox, 2010). Zwischen 1898 und 1900 wurde dann der Überträger der humanpathogenen Malariaerreger durch Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi

und Ettore Marchiafava ebenfalls identifiziert (Cox, 2010). Erst dadurch wurden wissenschaftliche Studien, welche bis zum heutigen Tag andauern, ermöglicht. Von den aktuell 400 bekannten *Anopheles*-Arten, sind 60 Überträger von Malaria-Parasiten, wovon 30 eine übergeordnete Rolle spielen (Tuteja, 2007).

1.3. Der Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*

1.3.1. Biologie und Lebenszyklus

Der Malaria-Erreger *Plasmodium* wird durch weibliche Mücken der Gattung *Anopheles* (Stamm: *Arthropoda*, Klasse: *Insecta*, Ordnung: *Diptera*, Unterordnung: *Nematocera*, Familie: *Culicidae*) übertragen. Der Entwicklungszyklus von *Plasmodium* (Abbildung 1.2) ist streng wirtsspezifisch und in drei Phasen unterteilt: eine exoerythrozytäre Phase (ungeschlechtliche Vermehrung in den Hepatozyten des Menschen), eine erythrozytäre Phase (ungeschlechtliche Vermehrung in den Erythrozyten) und eine so genannte Gamogonie (geschlechtliche Entwicklung und Vermehrung in der Speicheldrüse der *Anopheles* Mücke) (Marti *et al.*, 2004, Piekarski, 1987).

Die in der folgenden Erläuterung eingeklammerten Zahlen verweisen auf die Nummerierung in Abbildung 1.2.

Wenn die *Anopheles*-Mücke den Wirt sticht, sondert sie während ihrer Blutmahlzeit mit dem Speichel gerinnungshemmende Substanzen ab. Auf diese Weise gelangen auch infektiöse Sporozoiten, welche sich in der Speicheldrüse der Mücke befinden, in den Wirt und mit dessen Blutstrom zur Leber (1) (Cowman & Crabb, 2006, Miller *et al.*, 2002), wo sie in die Hepatozyten eindringen (2) und zum Leberschizonten (3) heranreifen. Vor dem Invadieren einer Hepatozyte müssen die Sporozoiten allerdings eine Kupffersche Zelle passieren, was etwa 15 – 30 Minuten post Infektion stattfindet (Frevert *et al.*, 1993). Überdies gibt es Hinweise darauf, dass die Sporozoiten erst mehrere Hepatozyten passieren, bevor der nächste Entwicklungsschritt eingeleitet wird (Mota *et al.*, 2001). In den Hepatozyten findet die exoerythrozytäre Schizogonie (Vermehrung durch Teilung) statt, wodurch bis zu 30.000 Merozoiten entstehen (Miller *et al.*, 2002). Durch Aufplatzen des Leberschizonten (4) gelangen die Merozoiten in die Blutbahn. Im Falle von *P. vivax* verbleiben Hypnozoiten ungeteilt im Lebergewebe. In diesem Ruhezustand können sie mehrere Monate bis Jahre verbleiben (Mehlhorn & Piekarski, 2002). Durch einen noch ungeklärten Impuls entwickeln

sie sich zu Schizonten und es kommt zum ersten Auftreten Krankheitssymptome (Lindner *et al.*, 2012). Die Merozoiten in der Blutbahn befallen nun die Erythrozyten (5). Sie invadieren sie und transformieren sich dort zu Ringformen und reifen zum Trophozoiten heran (Cowman *et al.*, 2012). Diese wiederum wandeln sich zu einem Schizonten um, der nach dem Aufplatzen zwischen acht und zwölf Merozoiten freisetzt, bei *P. falciparum* können es sogar bis zu 32 (6) werden (Cowman & Crabb, 2006). Einige wenige Merozoiten entwickeln sich zu Gametozyten, den Geschlechtsformen (7), welche sich nach etwa einer Woche in geringer Anzahl im Blut befinden. Aus diesem Grund bleiben sie in der Routinediagnostik unentdeckt. Diese Gametozyten (männliche Gametozyten = Mikrogametozyten und weibliche Gametozyten = Makrogametozyten) werden bei erneutem Mückenstich von ihr aufgenommen (8) und entwickeln sich im Darm zu Gameten. Durch Penetration des Makrogameten durch den Mikrogameten entsteht eine Zygote (9), welche eine längliche Form annimmt und zum beweglichen Ookinet wird (10). Dieser lagert sich inmitten der Gewebeschichten des Mückendarms an, wo er sich zur Oocyste wandelt (11) (Cowman & Crabb, 2006). Darin entstehen bis zu 1000 Sporozoiten, die nach Freisetzung (12) in die Speicheldrüsen der Mücke wandern und bei einem erneuten Stich in die Blutbahn des Menschen gelangen (Tuteja, 2007). Damit beginnt der Kreislauf nun von neuem.

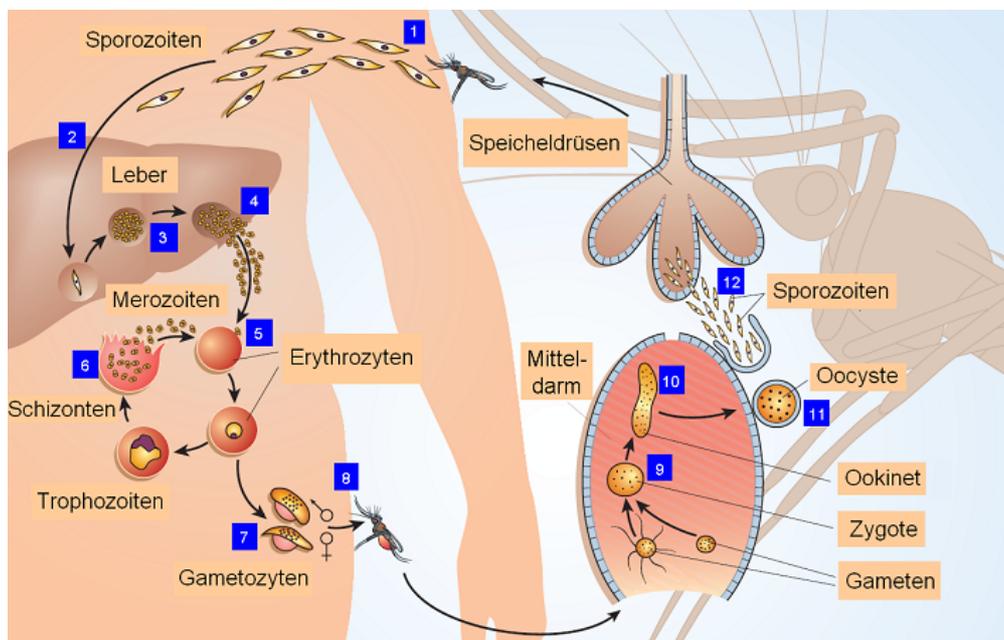


Abbildung 1.2.: Entwicklungszyklus der humanpathogenen Malaria-Erreger

Der gesamte Entwicklungszyklus spielt sich in drei Phasen ab, wobei die geschlechtliche Vermehrung nur im Vektor, der weiblichen *Anopheles*-Mücke, stattfinden kann. Erläuterungen mit entsprechender Nummerierung im Text (Abbildung verändert nach Menard, 2005).

Der Zeitraum eines Entwicklungszyklus in der Mücke beträgt je nach Außentemperatur 8 - 16 Tage und erfordert eine Mindesttemperatur von 16°C - 18°C. Bei niedrigeren Temperaturen kann die Sporogonie nicht vollendet werden und folglich keine Übertragung des Erregers stattfinden (Scotto, 2010).

1.3.2. Das Krankheitsbild

Der Verlauf von Malaria beginnt immer mit uncharakteristischen Beschwerden. Typische Symptome sind Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen in Verbindung mit einem allgemeinen Krankheitsgefühl. Es kommt zu Müdigkeit, Durchfall und Erbrechen sowie zu Schweißausbrüchen, Schüttelfrost und Schwindel (Marsh & Snow, 1997, Scotto, 2010). Gerade wegen dieser unspezifischen Symptome und der langen Inkubationszeit zwischen Infektion und Ausbruch der Krankheit kommt es oft zu Fehldiagnosen wie beispielsweise grippaler Infekt oder Magen-Darm-Infektion.

Je nachdem um welche Art der Malaria es sich handelt, unterscheiden sich die Symptome. Diese werden verursacht durch das Aufplatzen der Erythrozyten und die dadurch freigesetzten Parasiten und erythrozytären Abfallstoffe. Die damit einhergehenden Fieberschübe, die je nach Art des Erregers in unterschiedlichen Zeitintervallen auftreten, sind Teil des wirtseigenen Selbstschutzmechanismus (Alberts *et al.*, 2003, Stich *et al.*, 2000). Sie werden durch parasitäre Toxine wie z. B. das "*merozoite surface antigen 1*" (MSP-1) und durch die schon erwähnten Abfallstoffe der Erythrozyten ausgelöst. Diese Antigene regen Makrophagen unter anderem zur Bildung von fieber- und entzündungsfördernden Cytokinen wie dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) und dem Interleukin I (IL-I) an (Alberts *et al.*, 2003, Scotto, 2010). Bei Mischinfektionen treten die Fieberschübe meist ungleichmäßig auf und erschweren so zusätzlich eine eindeutige Diagnose (Mehlhorn & Piekarski, 2002).

Bei älteren Menschen bewirkt eine sogenannte, in Endemiegebieten erworbene Semi-Immunität (Teilresistenz) einen mildereren Verlauf der Krankheit und dadurch auch eine geringere Letalität. Diese Teilresistenz ist zeitlich limitiert und muss für jeden Plasmodien-Stamm von neuem erworben werden (Wenk & Renz, 2003).

Malaria tropica wird durch die Plasmodien-Art *P. falciparum* verursacht und stellt für den Menschen die bedrohlichste Form der Krankheit dar. Bei fehlender oder zu später Behandlung kann diese tödlich verlaufen (Robert-Koch-Institut, 2010). Eine hohe Parasitämie, die ausgeprägte Anämie und häufig vorkommende neuronale Komplikationen sind hierbei kennzeichnend (Tuteja, 2007). Im Verlauf der Krankheit kann es zu regelmäßig

auftretenden (48-Stunden-Rhythmus) oder zu unregelmäßigen, ständig wiederkehrenden Fieberschüben kommen (Mehlhorn & Piekarski, 2002). Durch das teilweise arrhythmisch verlaufende hohe Fieber wird eine klare Diagnose erschwert und es kann zu einem Multiorganversagen kommen (Stich *et al.*, 2000).

Die schweren Krankheitsverläufe der *Malaria tropica* sind auf die Zytoadhärenz infizierter Erythrozyten zurückzuführen. Sie heften sich an den Endothelzellen von Kapillaren fest, binden aber auch an uninfizierte Erythrozyten, wodurch es zu der sogenannten Rosettenbildung ("rosetting") kommt, einer Verklumpung der Erythrozyten (Wahlgren *et al.*, 1992). Dadurch verhindert der Parasit die Degradation alter und schadhafter Erythrozyten in der Milz. Aufgrund dieser Zytoadhärenz können Gefäßverschlüsse entstehen, was zu einer Behinderung der Blutzirkulation führt. Der damit einhergehende Sauerstoffmangel in den verschiedenen Organen (Berendt *et al.*, 1994, Cooke *et al.*, 1995) hat schwerwiegende Folgen. Bei der zerebralen Malaria kommt es wenige Stunden nach Auftreten der ersten Symptome zu Krampfanfällen, Verwirrtheit und Bewusstseinsstörungen, die zum Koma und in der Folge zum Tod führen können (Stich *et al.*, 2000). Die Folgen einer mit der ersten Schwangerschaft verknüpften maternalen Malaria sind Früh- oder Totgeburten oder auch ein vermindertes Geburtsgewicht des Kindes. Es kommt auch zu Aborten, schweren Anämien oder zum Tod der Mutter (Andrews & Lanzer, 2002, Menendez, 1995). Außerdem treten Lungenödeme auf, es kommt zum Nierenversagen und zu Gewebeschäden. Weitere Auswirkungen sind Schwarzwasserfieber (Hämoglobinurie), einer Vergrößerung der Milz, Leberversagen und Acidose (Stich *et al.*, 2000). Die Zytoadhärenz basiert auf dem *P. falciparum* Erythrozyte membrane protein 1 (PfEMP1), einer Familie immunovarianter Adhesine (Baruch *et al.*, 1995, Smith *et al.*, 1995, Su *et al.*, 1995), auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

1.4. Strukturelle Veränderungen des Erythrozyten nach Infektion durch *P. falciparum*

Der menschliche Erythrozyt verfügt weder über einen Lipid Synthesemechanismus, noch besitzt er diverse für den Parasiten essentielle Nährstoffe (Baumeister *et al.*, 2006). Aus diesem Grund muss der Parasit diese Stoffe aus dem Blutplasma beziehen. Hierfür induziert der Parasit – einige Stunden nach der Invasion des Erythrozyten – neue Transportwege, die oben schon erwähnten NPPs (Kirk, 2001). Diese vermitteln den Transport von Molekülen wie

Aminosäuren, Zucker, Nucleoside, Vitamine und diverse organische und anorganische Ionen (Kirk & Saliba, 2007). Die molekularen Grundlagen der NPPs liegen noch im Dunkeln.

Nachdem *P. falciparum* in den Erythrozyten eingedrungen ist, exprimiert der Parasit während seiner intrazellulären Entwicklung Proteine sowohl im Zytoplasma der Wirtszelle als auch auf deren Oberfläche (Halдар & Mohandas, 2007). Dies führt zu grundlegenden strukturellen Veränderungen des Erythrozyten, welche bei einer Infektion mit den übrigen humanpathogenen *Plasmodium*-Arten nicht stattfinden (Miller *et al.*, 2002). Eines dieser durch den Parasiten exprimierten virulenten Proteine ist **PfEMP1** ("*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1"). Es gehört zu einer immunvarianten Familie von Oberflächen-Adhesinen (variant antigen family) und wird von den **var-Genen** kodiert. Das Protein wird mit cerebraler und plazentaler Malaria in Verbindung gebracht (Halдар & Mohandas, 2007). Weitere, zur Virulenz beitragende Protein-Familien sind **STEVOR** ("subtelomeric variable open reading frames") und **RIFIN** ("repetitive intersped family"), welche ebenfalls für ihre genetische Variabilität bekannt sind (Stich *et al.*, 2000). In vorangegangenen Untersuchungen gelang es, eine elf Aminosäuren große Signalsequenz zu identifizieren, die in diesen und vielen anderen virulenten Proteinen konserviert ist und den Export in die Wirtszelle vermittelt (Hiller *et al.*, 2004, Marti *et al.*, 2004). Diese Signalsequenz kommt in über 400 putativen Effektor-Proteinen (Proteine, die in die Wirtszelle dirigiert werden) vor, was auf die Komplexität der Erythrozyten-Modifikation deutet (Halдар & Mohandas, 2007).

Hunderte sekretorischer Proteine des Parasiten besitzen ein Export Motiv, **PEXEL** (*Plasmodium* Export Element) genannt, welches für den Export von parasitären Proteinen außerhalb der parasitophoren Vakuole notwendig ist (Bhattacharjee *et al.*, 2008). Die Expression dieser parasitären Proteine auf der Wirtszelle äußert sich einerseits in der Ausbildung knopfartiger Höcker ("knobs") auf der Erythrozytenmembran und andererseits in Form eines membranartigen Netzwerkes, der Maurer Spalten (Lanzer *et al.*, 2006), worauf im weiteren Verlauf dieses Abschnitts genauer eingegangen wird. Außerdem werden neue Transportrouten induziert, die so genannten **NPPs** ("new permeation pathways"), wodurch die Aufnahme bestimmter Nährstoffe um ein Vielfaches erhöht wird (Ginsburg *et al.*, 1983, Kirk, 2001, Martin & Kirk, 2007). Die molekularen Grundlagen hierfür sind allerdings noch weitgehend ungeklärt.

Die knobs heften sich mit Hilfe der exprimierten Proteine an den Endothelzellen der Kapillaren an und sind somit für die Kapillarensquestration verantwortlich. Es kommt auch zu der oben schon erwähnten Rosettenbildung, wobei infizierte Erythrozyten sich an uninfizierte heften. Dies führt zu Strömungsblockaden bis hin zum Verschluss des Gefäßes. Die dadurch verursachte Behinderungen der Blutzirkulation und der damit einhergehende Sauerstoffmangel in den verschiedenen Organen (Berendt *et al.*, 1994, Cooke *et al.*, 1995) führt zu schwerwiegenden Folgen wie cerebraler oder plazentaler Malaria (Miller *et al.*, 2002). In den knobs sind die parasitären Proteine PfEMP1 und **PfKAHRP1** (*P. falciparum* knob associated histidine rich protein 1) verankert. Durch Interaktion mit verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts wie z. B. Spectrin, Ankyrin und Actin verändern die knobs auch physikalische Eigenschaften der Wirtszelle (Kilejian *et al.*, 1991a, Kilejian *et al.*, 1991b, Pei *et al.*, 2005).

PfEMP1 wird im Trophozoiten-Stadium an der Oberfläche der Erythrozyten präsentiert. Es interagiert mit verschiedenen Wirtszell-Rezeptoren wie CD36 (Barnwell *et al.*, 1989, Ockenhouse *et al.*, 1989), ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule 1"), VCAM-1 ("vascular cellular adhesion molecule 1") und CR1 ("complement-receptor 1") sowie CSA ("chondroitin-4-sulphat A") und Heparansulfat (Newbold *et al.*, 1999, Reeder *et al.*, 2000, Stich *et al.*, 2000, Viebig *et al.*, 2007), welche sich auf den Endothelzellen verschiedener Organe und Blutgefäße befinden (Craig & Scherf, 2001, Hempelmann *et al.*, 2009). Dieses Protein setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Der eine, der zytoplasmatische Anker, ist über PfKAHRP fest mit dem Zytoskelett des Erythrozyten verbunden und unter allen PfEMP1 Varianten hochkonserviert. Der andere ragt über eine transmembrane Domäne weit aus der Oberfläche des Erythrozyten heraus. Dieser Teil setzt sich ist aus einer cysteinreichen Domäne (CIDR) und einer variablen Anzahl von „DBL-Domänen“ ("duffy binding like") zusammen (Stich *et al.*, 2000).

PfEMP1 wird von der *var*-Multigen-Familie kodiert, deren Gene hauptsächlich an den subtelomeren Domänen der Chromosomen liegen (Fischer *et al.*, 1997, Hernandez-Rivas *et al.*, 1997). Bislang sind 60 Mitglieder dieser Familie in *P. falciparum* identifiziert worden. In den Endregionen, den subtelomeren Regionen der Chromosomen, werden epitopische Rekombinationsereignisse begünstigt, was dem Parasiten eine hohe Antigenvarianz verleiht (Stich *et al.*, 2000). Diese Varianz ist unter anderem für die Virulenz von *P. falciparum* verantwortlich, da der Parasit auf diese Weise der humoralen Immunantwort des Wirtes entgehen kann (Roberts *et al.*, 1992).

Die Expression der *var*-Gene unterliegt einer sehr präzisen Regulierung. Je Generation schaltet der Parasit mit einer Rate von 2 % auf ein neues *var*-Gen um (Roberts *et al.*, 1992, Stich *et al.*, 2000). Ein bisher noch inaktives *var*-Gen wird angeschaltet, das noch aktive abgeschaltet. Es ist also immer nur eines der *var*-Gene aktiv, d. h. nur eine PfEMP1 Variante wird exprimiert. Der diesem Phänomen zugrunde liegende Mechanismus auf molekularer Ebene ist noch ungeklärt. Die Entscheidung, welches *var*-Gen aktiviert wird, fällt im Ringstadium. Zu diesem Zeitpunkt werden noch alle *var*-Gene transkribiert, ohne jedoch Proteinprodukte zu synthetisieren (Hviid, 2010). Wenn die Zelle zum Trophozoiten heranwächst, werden alle *var*-Gene bis auf eines abgeschaltet. Dieses kodiert dann das exprimierte PfEMP1 (Stich *et al.*, 2000).

P. falciparum ist in der Lage, synthetisierte Proteine an die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) zu dirigieren. Er verfügt über eine Proteinsortierungs-Maschinerie mit den klassischen, in Eukaryoten vorkommenden Komponenten: den in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums lokalisierten Proteintranslokator Sec61-Komplex (Couffin *et al.*, 1998), eine Typ I Signalpeptidase (Sharma *et al.*, 2005), ein Golgi Netzwerk (Struck *et al.*, 2005) und diverse, für den Vesikeltransport notwendige Proteine wie beispielsweise SNAREs (Adisa *et al.*, 2002, Ayong *et al.*, 2007). Problematisch wird es allerdings, wenn Proteine über die Grenze der PVM hinaus transportiert und auf der Oberfläche der Wirtszelle exprimiert werden sollen. Der Erythrozyt verfügt nämlich über kein endogenes vesikuläres Transportsystem (Tilley *et al.*, 2008). Wie also löst der Parasit dieses Problem?

Maurer Spalten ("Maurer's clefts"), nach Georg Maurer benannte und von ihm erstmals im Jahr 1900 beschriebene, dem parasitären Stoffwechsel entstammende membranöse Strukturen, unterstützen den Transportverkehr von *Plasmodium*-Proteinen, so dass diese an der Zelloberfläche des Erythrozyten exprimiert werden können (Lanzer *et al.*, 2006, Wickert & Krohne, 2007). Maurer Spalten besitzen Proteine wie **PfSBP1** ("*P. falciparum* skeletal binding protein-1") (Blisnick *et al.*, 2000, Saridaki *et al.*, 2009), **MAHRP-1** ("membrane associated histidine-rich protein-1") (Spycher *et al.*, 2003, Spycher *et al.*, 2006) und **PfREX-1** und **-2** ("ring exported protein-1 and -2") (Spielmann *et al.*, 2006) und außerdem noch Proteine aus der STEVOR- (Kaviratne *et al.*, 2002, Przyborski *et al.*, 2005) und RIFIN-Familie (Khattab & Klinkert, 2006).

Abbildung 1.3. zeigt eine schematische Darstellung möglicher Synthesewege zur Expression parasitärer Proteine an der Wirtsmembran (d. h. der Erythrozytenmembran), wodurch die Aufnahme unterschiedlicher Nährstoffe außerhalb des Erythrozyten ermöglicht werden soll.

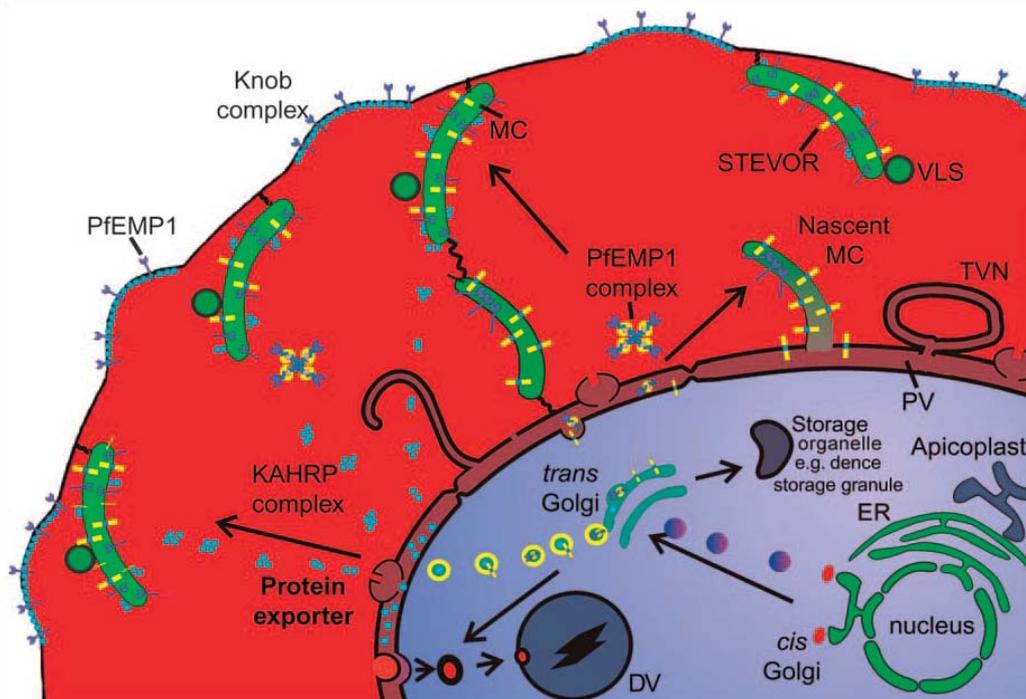


Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung der strukturellen Veränderungen des infizierten Erythrozyten
Gezeigt werden einige, durch *P. falciparum* induzierte, putative Synthesewege, in denen der Erythrozyt mit für den Parasiten notwendige Proteinen ausgestattet wird (Quelle: Tilley *et al.*, 2008)

1.5. Bekämpfung der Malaria

Es sind in der Vergangenheit viele verschiedene Projekte zur Bekämpfung der Malaria entworfen worden. Viele bezogen sich auf Vektorkontrolle, chemotherapeutische Behandlung erkrankter Menschen, Aufklärung der betroffenen Bevölkerung, und in einigen Gebieten konnte ein teilweise beträchtlicher Rückgang der Krankheits- und Sterberate verzeichnet werden. Allerdings ist man immer noch weit entfernt von einer umfassenden Lösung für das tropische Afrika und viele Gebiete Südostasiens (Greenwood *et al.*, 2005).

Alle bis zum heutigen Tag unternommenen Anstrengungen, einen effektiven, weltweit einsetzbaren Impfstoff gegen Malaria zu entwickeln, blieben aufgrund der hohen Variabilität der Malaria-Antigene erfolglos. Es gibt aber einen in der Entwicklung befindlichen Impfstoff mit dem Namen **RTS,S** (oder Mosquirix), der zumindest eingeschränkt wirksam ist (Agnandji *et al.*, 2012, Agnandji *et al.*, 2011, Brooks *et al.*, 2012, Leach *et al.*, 2011).

Die Bekämpfung der Krankheit konzentriert sich verstärkt auf Chemotherapie und Chemoprophylaxe mit Medikamenten, welche die Ausbreitung des Parasiten im menschlichen Körper eindämmen sollen. Am weitesten verbreitet sind die natürlichen Komponenten der Chinarinde: der pharmazeutisch wirksame Inhaltsstoff Chinin (QN) und die daraus

abgeleiteten 4-Aminochinolin- und Arylaminoalkohol-Antimalaria-Wirkstoffe sowie der nahe mit QN verwandte, synthetisch hergestellte Arzneistoff Chloroquin (CQ). Das Problem hierbei ist allerdings, dass durch den starken Einsatz dieser Medikamente in den vergangenen Jahrzehnten *Plasmodium* in vielen Endemiegebieten Resistenzen gegen sie entwickelt hat, wodurch es in den letzten Jahren wieder zu einem Anstieg an Malariaerkrankungen gekommen ist (WHO, 2012, Wiesner *et al.*, 2003). Aus diesem Grund erscheint es wichtig, die molekularen Grundlagen dieser Resistenzen zu begreifen.

1.6. Anti-Malaria Wirkstoffe

Gemessen an der Bedeutung der Malaria ist die Anzahl der gegenwärtig verfügbaren Wirkstoffe gegen die Erreger verhältnismäßig gering. Starke Nebenwirkungen einiger Medikamente, die ungenügende Verfügbarkeit mancher Substanzen in den besonders betroffenen Gebieten der Welt und die schon erwähnte starke Verbreitung von Resistenzen grenzen die Möglichkeiten stark ein (Schlitzer, 2009b).

In den vergangenen Jahren wurde die Entwicklung von therapeutisch einsetzbaren Wirkstoffen gegen Malaria deutlich vorangetrieben (Schlitzer, 2008, Schlitzer, 2009b). Dies lässt auf neue Wege zur Bekämpfung der Krankheit hoffen.

Dieser Abschnitt soll einen kurzen Überblick über die gängigen, derzeit eingesetzten Wirkstoffe geben. Darüber hinaus sei kurz auf die im Entwicklungsstadium befindlichen Substanzen hingewiesen

Traditionell werden Malaria-Wirkstoffe entsprechend ihres Wirkortes innerhalb des Lebenszyklus' von *Plasmodium* klassifiziert (Abbildung 1.4.) (Schlitzer, 2007). Sie werden in vier Stoffklassen eingeteilt. **Blutschizontizide** wirken im asexuellen intraerythrozytären Entwicklungsstadium des Parasiten. **Gewebeschizontozide** töten Leberschizonten ab, wodurch sie der Erythrozyteninvasion durch den Parasiten vorbeugen und somit prophylaktisch wirken. **Hypnozoitizide** töten ungeteilt im Lebergewebe verbleibende Hypnozoiten von *P. vivax* und *P. ovale* ab, welche Jahre nach der Infektion zu Schizonten heranreifen können, wirken also als Prophylaxe gegen charakteristische Rückfälle der Malaria tertiana vor. **Gametocytozide** zerstören Geschlechtsformen des Parasiten und verhindern dadurch die Transmission vom Menschen zur weiblichen *Anopheles*-Mücke. Da bei der durch *P. falciparum* verursachten Malaria tropica keine ruhenden Hypnozoiten vorkommen, genügt

eine Behandlung mit Blutschizontiziden. Im Falle einer Infektion mit *P. vivax* oder *P. ovale* ist eine Kombinationstherapie von Blut- und Gewebsschizontiziden nötig (Schlitzer, 2007).

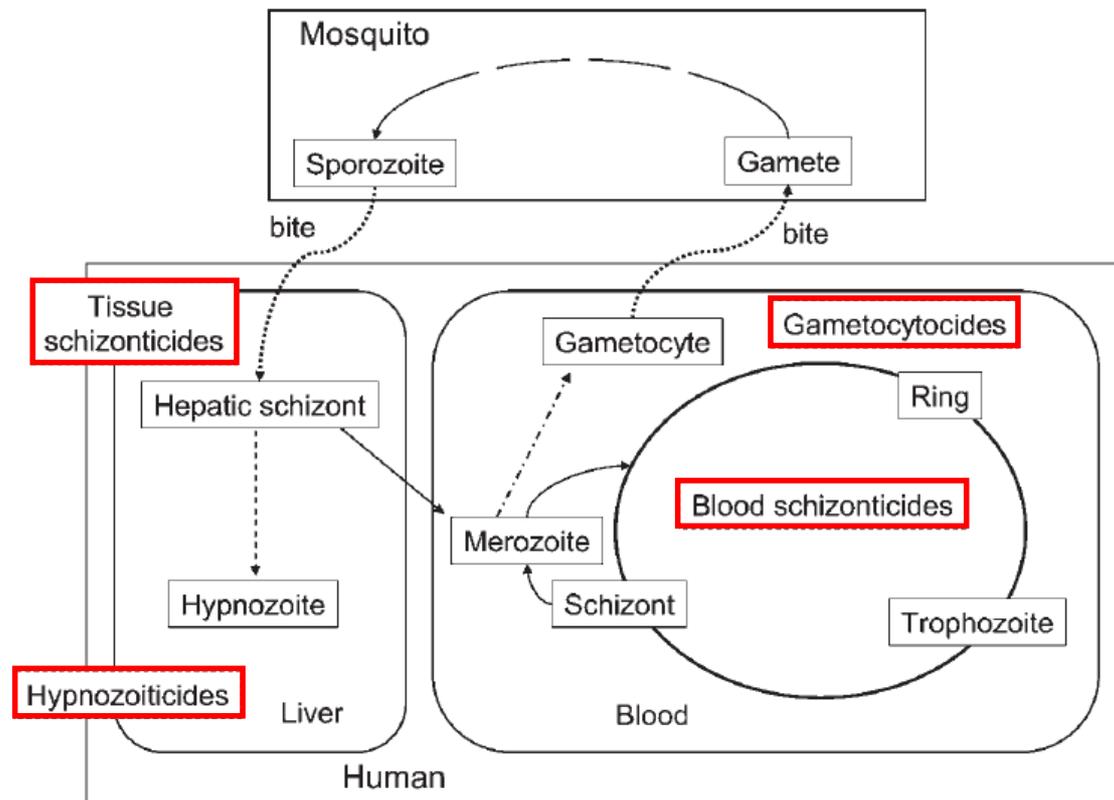


Abbildung 1.4.: Klassifizierung der Wirkstoffe gegen Malaria in Abhängigkeit ihres Wirkortes
Wirkstoff-Klassen (rote Kästen) zur Malaria-Behandlung in den einzelnen Entwicklungsphasen von *Plasmodium* (Abbildung verändert nach Schlitzer, 2007)

Weil *P. falciparum* für den größten Teil der durch Malaria verursachten Todesfälle verantwortlich ist, liegt der Schwerpunkt der Malaria Chemotherapie in der Bekämpfung eben dieser *Plasmodium*-Art. Die hierfür verwendeten Arzneistoffe entstammen folgenden Substanzklassen: Antifolate, Hemmstoffe der Atmungskette, Antibiotika, Artemisinine, Aminoquinoline und Arylaminoalkohole (Schlitzer, 2009a).

1.6.1. Antifolate

Folsäure stellt die Vorstufe des Coenzym Tetrahydrofolsäure (THF) dar, welche unter physiologischen Voraussetzungen als Anion vorliegt (Tetrahydrofolat) (Mayer, 2009). THF liefert insbesondere Methyl- (CH_3 -), Methenyl- ($\text{CH}_2=$) und Formyl-Gruppen (HCO -) und ist somit an der Synthese von Purinbasen und desoxy-Thymidinmonophosphat (dTMP) beteiligt

(Hahn, 2009, Paul *et al.*, 2004), welche Bestandteil von DNA sind. Während der Mensch auf die Aufnahme von Folsäure über die Nahrung angewiesen ist, sind Prokaryoten und Protozoen in der Lage, diese innerhalb des Folatstoffwechsels selbst zu synthetisieren. Die Biosynthese von Tetrahydrofolat wird unter anderem durch zwei Enzyme katalysiert: Dihydropteroat-Synthase (DHPS) und Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) (Hyde, 2005). Aus diesem Grund ist die Hemmung dieser Enzyme ein seit langem genutztes Prinzip in der antimikrobiellen Chemotherapie (Nzila, 2006, Schlitzer, 2007).

Die Substanzklasse der Antifolate beinhaltet unter anderem **Sulfadoxin**, **Dapson**, **Pyrimethamin** und **Proguanil**. Sulfadoxin ist ein Sulfonamid, welches als kompetitiver Inhibitor von DHPS fungiert, Dapson stammt, obwohl es chemisch ein Sulfon ist, aus der Gruppe der Sulfonamide und stellt ein Pseudosubstrat für DHPS dar (Schlitzer, 2009b). Pyrimethamin und Proguanil, aus dem durch Oxidation die Wirkform Cycloguanil entsteht, sind Inhibitoren der DHFR (Nzila, 2006). Allein haben diese DHPS-Inhibitoren nur eine schwache Wirkung gegen Malariaparasiten, im Zusammenspiel mit DHFR-Inhibitoren hingegen besteht ein ausgeprägter synergistischer Effekt, weshalb diese beiden Substanzklassen in Kombinationen miteinander eingesetzt werden (Schlitzer, 2009a). Zur Kombinationstherapie von Sulfadoxin/Pyrimethamin wird das Medikament Fansidar[®] eingesetzt, die Kombination von Dapson/Cycloguanil ist als LapDap[®] erhältlich (Schlitzer, 2007).

Resistenzen gegen Antifolate entstehen unter anderem durch Mutationen in der DHFR. Sulfadoxin/Pyrimethamin, einst führende Kombinationstherapie (Baird, 2005) gegen Malaria, wurde aufgrund der Ausbreitung von Mutationen im *dhfr*-Gen als Chemotherapie abgesetzt. Dapson/Proguanil wirkt gegen in Afrika vorkommende *P. falciparum*-Stämme mit dreifacher Mutation im *dhfr*-Gen, nicht aber gegen in Asien und Südamerika vorkommende *P. falciparum*-Stämme mit vierfach-Mutationen (Wilairatana *et al.*, 1997).

1.6.2. Hemmstoffe der Atmungskette

Atovaquon gehört zu der Gruppe der Naphthochinone und kann als Struktur analogon des Ubichinons betrachtet werden. Ubichinon nimmt in der Mitochondrien-Membran zwei Elektronen von diversen Dehydrogenasen auf und bindet anschließend in die Bindetasche des Cytochrom-bc₁-Komplexes der Atmungskette (Schlitzer, 2009a).

Ein Elektron wird auf einen Eisen-Schwefel-Komplex des so genannten Rieske-Proteins (Schlitzer, 2009a) übertragen und anschließend durch die Verschiebung einer Domäne dieses Proteins zum Cytochrom c₁ transportiert. Nun bindet anstelle des Ubichinons Atovaquon in

dessen Bindetasche, wodurch das Rieske-Protein fixiert wird. Als Folge davon wird der Elektronentransport unterbrochen, was zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und damit zu einem schnellen Absterben der Parasiten führt (Schlitzer, 2009a). Durch eine Monotherapie mit Atovaquon kommt es jedoch sehr schnell zur Ausbildung von Resistenzen. Der Austausch einer hydrophoben Aminosäure gegen eine hydrophile an Position 268 (Y268S bzw. Y268C) verringert die hydrophobe Bindung des Cyclohexylrestes des Atovaquons, wodurch dessen Affinität zum Cytochrom-bc₁-Komplex um mehr als das 1000-fache verringert wird (Boggild *et al.*, 2007, Schlitzer, 2007, Schlitzer, 2008, Srivastava *et al.*, 1999, Vaidya & Mather, 2000). Deshalb wird es als Kombinationstherapie Atovaquon/Proguanil (Malarone[®]) eingesetzt.

Unter normalen Bedingungen wird das mitochondriale Membranpotential durch die Atmungskette aufrechterhalten. Ist der Atovaquon-vermittelte Elektronentransport gehemmt, kommt ein alternativer Weg zum Tragen. Darin wird ATP zu ADP hydrolysiert und durch einen membranständigen Transporter wiederum gegen ATP ausgetauscht. Dies hat einen Netto-Einwärtstransport negativer Ladungen zur Folge (Schlitzer, 2009a). Dieser alternative Weg wird durch Proguanil gehemmt (Painter *et al.*, 2007, Painter *et al.*, 2010). Malarone[®] wird zur Prophylaxe gegen Malaria tropica und zur Behandlung unkomplizierter Malaria eingesetzt (Patel & Kain, 2005).

1.6.3. Antibiotika

Antibiotika wie **Doxycyclin**, **Clindamycin** und **Azithromycin** wirken vermutlich auf den Proteinbiosyntheseapparat des Apikoplasten (Schlitzer, 2009a). Ein Wirkmechanismus bestimmter Antibiotika wird als verzögerter Wirktyp (“delayed death effect“) bezeichnet. Hierbei werden Parasiten erst während des zweiten intraerythrozytären Zyklus abgetötet (Dahl *et al.*, 2006, Ramya *et al.*, 2007). Wahrscheinlich unterbinden bestimmte Antibiotika im bei der asexuellen Teilung der Parasiten neu entstandenen Apikoplasten die Synthese von Proteinen, welche eine essentielle Rolle für die darin stattfindenden Biosynthesewege spielen. Durch den verzögerten Wirktyp kommt es konsequenterweise erst nach etwa vier Tagen zu einem Abklingen der Symptomatik, was bei nicht-immunen Patienten deutlich zu spät wäre. Daher sind Antibiotika nur in Kombination mit effizienteren, schneller wirksamen Medikamenten wie beispielsweise Chinin oder Artesunat sinnvoll. Antibiotika gelten als wertvolle Kombinationspartner, da keine dokumentierten Fälle klinisch relevanter Resistenzen vorliegen (Schlitzer, 2008). Das in Kombination mit Chinin oder Artesunat verwendete Doxycyclin stellt den wichtigsten Vertreter aus der Gruppe der Tetracycline dar

(Ashley & White, 2005). Alternativ dazu verwendet man Clindamycin, welches durch geringere Nebenwirkungen bei schwangeren Frauen und auch bei Kindern (Lell & Kremsner, 2002) einen Vorteil gegenüber Doxycyclin hat. Des Weiteren gibt es Azithromycin, welches aber im Vergleich zu Doxycyclin eine geringere Effektivität gegen *Malaria tropica* aufweist (Taylor *et al.*, 2003).

1.6.4. Artemisinin-Derivate

Die Wirkstoffgruppe der Artemisinine hat ihren Ursprung in der traditionellen chinesischen Medizin. Schon vor 2000 Jahren wurde in China der Einjährige Beifuß *Artemisia annua* als Heilpflanze gegen Hämorrhoiden verwendet, seit 1596 auch zur Behandlung von Fieber (Wiesner *et al.*, 2003). 1972 wurde das Sesquiterpen **Artemisinin** als aktiver Inhaltsstoff isoliert (Klayman, 1985). Es besitzt eine sehr gute Wirksamkeit gegen Malaria. In Versuchsansätzen mit vierzig Feldisolaten aus Nordwest Thailand konnten IC₅₀-Werte (Konzentration eines Medikaments, bei der 50 % der Parasiten absterben) zwischen 8,2 und 17,9 nM erreicht werden, innerhalb einer anderen Studie nur geringfügig höher (Ramharter *et al.*, 2002, Tanariya *et al.*, 2000). Es ist allerdings sowohl in Wasser als auch in Öl schlecht löslich, weshalb heute ausschließlich semisynthetische Artemisinin-Derivate wie **Artemether** (entsteht durch Methylierung der Hydroxylgruppe), **Artesunat** (entsteht durch Veresterung der halbacetalischen Hydroxylgruppe mit einer der beiden Carboxylgruppen der Bernsteinsäure) und **Dihydroartemisinin** (entsteht durch Reduktion der Laktone-Teilstruktur) verwendet werden (Schlitzer, 2007). Artemisinine wirken selbst auf die frühesten erythrozytären Entwicklungsstadien, die frühen Ringstadien und reduzieren somit die Parasitenlast um den Faktor 10⁴ pro asexuellem Zyklus, was sie zu den schnellsten und wirksamsten heute bekannten Malariatherapeutika macht (Schlitzer, 2009a). Es überrascht also wenig, dass Artemisinine die erste Wahl der Wirksubstanzen gegen *Malaria tropica* darstellen, insbesondere wegen der globalen Ausbreitung von Resistenzen gegen Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin (Krishna *et al.*, 2008). Die WHO empfiehlt sogar Artemisinin-Kombinationstherapien ("Artemisinin combination therapy" (ACT)) (Gould & Lienhard, 1989, WHO, 2010). Artemether-Lumefantrin, Artesunat-Mefolquin, Artesunat-Amodiaquin, Dihydroartemisinin-Piperaquine und Artesunat-Pyronaridine sind derzeit gängige ACTs (Eastman & Fidock, 2009).

Das typische Kennzeichen von Artemisininen bildet eine 1,2,4-Trioxan-Partialstruktur. Endoperoxid ist das für die Wirksamkeit essentielle Strukturelement. Ein bis vor wenigen Jahren anerkanntes Modell für den Wirkmechanismus der Artemisinine war, dass eine durch

Eisen-II-vermittelte Spaltung dieses essentiellen Strukturelements zur Bildung von Kohlenstoffradikalen führt. Diese reagieren dann mehr oder weniger wahllos mit dem Häm und mit allen sie umgebenden Proteinen, die sie inaktivieren (Schlitzer, 2009a). Vor wenigen Jahren allerdings wurde alternativ ein Wirkmechanismus vorgeschlagen, demzufolge Artemisinin-Derivate hochspezifisch PfATP6 hemmen, eine Calcium-ATPase, die Ca^{2+} -Ionen in das ER transportiert (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003, Schlitzer, 2007). Es ist jedoch noch unklar, ob für die Hemmung der PfATP6 eine eisenvermittelte Radikalbildung erforderlich ist.

Sollten Artemisinin-Derivate tatsächlich eine spezifische Zielstruktur wie diese PfATP6 haben, so ist es wahrscheinlich, dass es durch Mutationen im entsprechenden Gen zur Ausbildung von Resistenzen gegen diese Wirkstoffklasse kommt. Berichten aus jüngerer Vergangenheit zufolge gab es schon Fälle herabgesetzter Wirksamkeit (Dondorp *et al.*, 2010, O'Neill *et al.*, 2010).

1.6.5. Aminochinoline und Arylaminoalkohole

Die Rinde des in den Anden beheimateten *Cinchona*-Baums war der erste Ansatz zur gezielten Malaria-Therapie. Die zu Puder verarbeitete Rinde wurde schon seit Anfang des siebzehnten Jahrhunderts zur Behandlung von Fieber eingesetzt (Meshnick, 2001). Im Jahre 1820 wurde dann der aktive Inhaltsstoff **Chinin** aus der Baumrinde isoliert und zur Behandlung von Malaria eingesetzt (Wiesner *et al.*, 2003). Damit gehört Malaria zu den ersten durch eine chemische Reinsubstanz behandelten Krankheiten. Das erste mal, dass ein synthetischer Wirkstoff beim Menschen eingesetzt wurde, war 1891, als es Paul Ehrlich gelang, zwei Malariapatienten mit dem sich im Parasiten anreicherndem Farbstoff Methylenblau zu heilen (Guttman & Ehrlich, 1891). Heutigen Erkenntnissen zufolge wirkt Methylenblau als Glutathion-Reduktase-Inhibitor und stört somit den Redoxhaushalt des Parasiten (Wiesner *et al.*, 2003). Die Derivatisierung der Methylenblau-Struktur führte zur Synthese von **Primaquin** und **Resochin**, welches später in Chloroquin umbenannt wurde (Schlitzer, 2007).

Chloroquin (CQ) und **Amodiaquin** (AQ) gehören zur Familie der 4-Aminochinoline, **Primaquin** ist das aktuell einzige eingesetzte 8-Aminochinolin. CQ ist aufgrund der geringen Nebenwirkungen und Kosten sehr effizient. Der Nachteil von CQ besteht allerdings in seiner geringen Dosierbarkeit von nicht höher als 10 mg/kg. Eine höhere Dosis wäre toxisch bis tödlich (Taylor & White, 2004). Außerdem hat der starke Einsatz des Medikamentes weltweit zu resistenten *P. falciparum*-Stämmen geführt (Wellems & Plowe, 2001), wodurch CQ nicht

mehr als führender Wirkstoff in der Malariabehandlung angesehen werden kann. Das strukturell ähnliche AQ mit einem aromatischen Ring an seiner Seitenkette ist effektiv gegen leicht resistente *P. falciparum*-Stämme (Sa *et al.*, 2009) und wird hauptsächlich in Kombination mit Artemisinin angewendet (Eastman & Fidock, 2009). CQ und AQ wirken im intraerythrozytären Entwicklungsstadium, Primaquin wirkt in Leber- und Geschlechtsstadien. Es wird vorwiegend gegen Malaria tertiana eingesetzt (Hill *et al.*, 2006).

Mefloquin, Halofantrin, Lumefantrin und **Chinin** gehören zu den Arylaminoalkoholen (Schlitzer, 2009a). Mefloquin gilt als Standardmedikation gegen CQ resistente *P. falciparum*-Stämme, wird aber wegen seiner je nach Dosierung auftretenden neuropsychiatrischen Nebenwirkungen und des hohen Preises begrenzt angewendet (AlKadi, 2007, Wiesner *et al.*, 2003). Es wird in Kombination mit Artesunat eingesetzt (Eastman & Fidock, 2009). Halofantrin ist ebenfalls wirksam gegen CQ resistente *P. falciparum*-Stämme, wird aber wegen seiner starken Nebenwirkungen (Herz-Rhythmus-Störungen) nicht empfohlen (Touze *et al.*, 2002). Lumefantrin hat eine dem Halofantrin ähnliche Struktur, ist aber weniger wirksam. Es ist als Kombinationstherapeutikum mit Artemether unter dem Namen Riamet[®] erhältlich (Omari *et al.*, 2004). Schwere Malaria wird hauptsächlich mit Chinin behandelt. Herz-Rhythmus-Störungen und Komplikationen im zentralen Nervensystem sind selten, Nebenwirkungen wie Hypoglykämie können zu Komplikationen führen, weshalb der Blutzuckerspiegel überwacht werden sollte (Taylor & White, 2004). Seine Halbwertszeit beträgt 8 bis 12 Stunden und muss deshalb 3 mal täglich verabreicht werden (Okombo *et al.*, 2011).

1.6.6. Entwicklung neuer Wirkstoffe

Die Entwicklung von Resistenzen gegen bereits existierende Malaria-Medikamente erschwert nicht nur in hohem Maße den Kampf gegen die Krankheit, sie rückt auch die Notwendigkeit neuer Wirkstoffe in den Vordergrund, welche innovative Wege eröffnen könnten, um der globalen Katastrophe Malaria entgegenzutreten. In den letzten Jahren hat sich die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen die Krankheit deutlich intensiviert. Was also ist an neuen Möglichkeiten zu erwarten?

AQ-13 ist ein Chloroquin-Derivat mit verkürzter Seitenkette, wodurch seine Affinität zu PfCRT vermindert werden soll (Schlitzer, 2007, Schlitzer, 2008). Der Wirkstoff ist *in vitro* auch gegen Chloroquin-resistente Parasiten wirksam. Allerdings deutet eine klare Korrelation zwischen der Anfälligkeit einiger Feldisolate gegen AQ-13 und CQ auf einen gewissen Grad an Kreuzresistenz hin (Schlitzer, 2009b) In **tert-Butylisoquin** wurden die Positionen des

Hydroxyl- und des Diethylaminomethyl-Restes miteinander vertauscht, es könnte somit als ein Derivat des Amodiaquins aufgefasst werden. Durch diese Modifizierung wird die ungewollte Bildung von toxischen Chinoniminen unterbunden, die Wirksamkeit jedoch bleibt dadurch unbeeinträchtigt (Schlitzer, 2009b, Schlitzer, 2009a). Aufgrund der hohen Wirksamkeit gegen isolierte Malaria-Parasiten erfährt **Methylenblau** seit einigen Jahren wieder gesteigertes Interesse. Es war als Malaria-Therapeutikum in Vergessenheit geraten, nachdem es schon 1891 von Paul Ehrlich dafür eingesetzt worden war. Eine gut dokumentierte Toxikologie und der geringe Preis sind weitere Vorteile (Schlitzer, 2009b). Auffallend bei **Ferroquin** ist seine Ferrocenyl-Seitenkette (Dubar *et al.*, 2008). Es ist wirksam gegen diverse Laborstämme und Feldisolate, auch CQ resistente. Vermutlich unterbindet der relativ große Ferrocenylrest die Interaktion mit PfCRT. Ein weiterer im Entwicklungsstadium befindlicher Wirkstoff ist **T3**, dessen Ansatzpunkt („Target“) die Phospholipid Synthese des Parasiten sein soll (Caldarelli *et al.*, 2010, Schlitzer, 2008). Außerdem gibt es noch eine Vielzahl von in der frühen Entwicklungsphase befindlicher Substanzen als potentielle anti-Malaria Therapeutika (Schlitzer, 2009b).

1.7. Wirk- und Resistenzmechanismen von Chloroquin und Chinin

1.7.1. Wirkmechanismus von CQ und QN

Chloroquin ist eine schwache Base mit der Eigenschaft, Biomembranen durch Diffusion passieren zu können. Auf diese Weise gelangt es in die Nahrungsvakuole (NV) des Parasiten und reichert sich dort an (Sullivan, 2002). Bei dem in der NV herrschenden pH von $5,18 \pm 0,05$ (Kuhn *et al.*, 2007) in CQ resistenten wie auch in CQ sensitiven Stämmen liegt CQ in zweifach protonierter Form als Dikation vor und befindet sich aufgrund dessen nicht mehr in der Lage, die NV wieder zu verlassen. Dadurch wird in der NV, dem Ort der Hämoglobin Degradation (Sanchez *et al.*, 2007b), eine um mehrere Zehnerpotenzen höhere Konzentration als im Zytoplasma erreicht (Schlitzer, 2009a). Die Wirkungsweise von CQ besteht darin, dass es stabile Komplexe mit Ferriprotoporphyrin IX (FPIX) bildet und so die Zahl der nicht im Hämозoin gebundenen FPIX-Moleküle erhöht, was letztendlich zum Tod des Parasiten führt (Fitch, 2004, Gligorijevic *et al.*, 2006). Wie genau das geschieht, ist noch nicht geklärt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass FPIX-CQ-Komplexe auf einen noch unbekanntem Ansatzpunkt in der Membran wirken und durch den Anstieg der

Ca^{2+} -Konzentration eine vorzeitige Anhäufung der Transportvesikel bewirken, welche das Hämoglobin in die NV transportieren. Dadurch kann das Hämoglobin nicht mehr einwandfrei abgebaut werden, was zwangsläufig das Absterben des Parasiten zur Folge hat (Fitch, 2004, Schlitzer, 2007, Schlitzer, 2008, Schlitzer, 2009a). FPIX-CQ-Komplexe beeinträchtigen auch die Bildung von mit Hämoglobin beladenen Endosomen, wodurch sich das Hämoglobin in noch unreifen Endosomen anlagert (Fitch & Russell, 2006). Untersuchungen mit *Plasmodium berghei* infizierten Erythrozyten in Mäusen haben gezeigt, dass der Parasit in Anwesenheit von CQ bis zu 80 % seiner Fähigkeit verliert, β -Hematin auszubilden (Chou & Fitch, 1992). Außerdem verhindert CQ durch das so genannte "lipid masking" (Lipid-Maskierung) die Interaktion von in die Ausbildung von β -Hematin involvierten Lipiden mit FPIX. (Fitch *et al.*, 2003). Die Wirksamkeit von CQ beruht also auf der Akkumulation von FPIX und FPIX-CQ-Komplexen in der NV von *Plasmodium* (Fitch *et al.*, 2000)

Ebenfalls noch weitgehend ungeklärt ist der Wirkmechanismus von QN. Es behindert, genau wie CQ, die Hämoglobinverwertung des Parasiten, allerdings aller Wahrscheinlichkeit nach einem anderen Mechanismus folgend. Möglicherweise wirkt QN auf dieselbe Zielstruktur wie CQ, hemmt jedoch im Gegensatz dazu die Ca^{2+} -Freisetzung und verhindert dadurch die Verschmelzung von mit Hämoglobin beladenen Transportvesikeln mit der Nahrungsvakuole (Fitch, 2004, Schlitzer, 2007). In einer in der Vergangenheit durchgeführten Studie wurde die Morphologie von infizierten Erythrozyten elektronenmikroskopisch untersucht, nachdem diese zuvor mit CQ und mit Mefloquin, welches dem QN strukturell sehr ähnlich ist, behandelt worden waren. Es konnte dabei beobachtet werden, dass verschiedene Chinoline mit gleicher Zielstruktur verschiedene morphologische Auswirkungen auf den infizierten Erythrozyten haben (Olliaro *et al.*, 1989).

Mefloquin kann direkt an Membran-Phospholipide binden, CQ hingegen zeigt keine gesteigerte Bindungsaffinität für diese Strukturen (Chevli & Fitch, 1982). QN und das entsprechende Stereoisomer Chinidin (QD) sind auch in der Lage, Salzbrücken mit Häm auszubilden. Man vermutet, dass die Bildung dieser Salzbrücken die Formierung der Hemozin-Vorstufe des β -Hematins während der Häm-Detoxifizierung unterbricht und so die starke Wirksamkeit der beiden aktiven Isomere entfaltet (de Villiers *et al.*, 2008).

Die molekulare Struktur von CQ, QN und QD ist in Abbildung 1.5. dargestellt und veranschaulicht die strukturelle Ähnlichkeit untereinander.

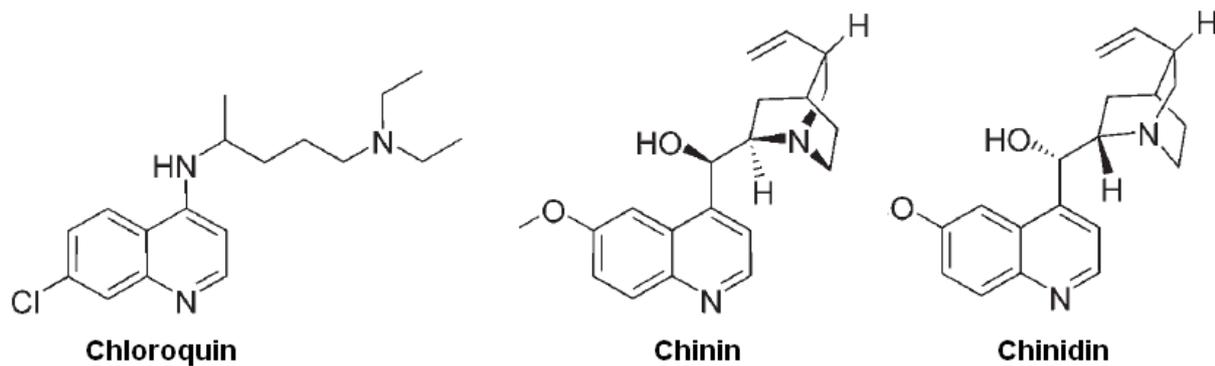


Abbildung 1.5.: Strukturformel von Chloroquin, Chinin und dessen Isomers Chinidins
(Quelle: Schlitzer, 2007)

1.7.2. CQ- und QN-Resistenz in *P. falciparum*

Was genau ist unter dem Begriff “Medikamentenresistenz“ zu verstehen? Die WHO definiert diesen als „Fähigkeit eines Parasiten-Stammes, trotz Verabreichung und Absorption eines Medikamentes in empfohlenen oder höheren Dosen zu überleben und/oder sich zu vermehren“ (WHO, 2005). Seit den ersten dokumentierten Fällen von CQ-Resistenz, 1957 in Thailand und 1960 in Kolumbien und Venezuela, hat sich die Resistenz in allen endemischen Gebieten der Erde ausgebreitet. Ausnahmen sind die Insel Hispaniola und Zentralamerika. In Afrika hat sich die CQ-Resistenz erst viel später als in Südamerika und Südostasien ausgebreitet (WHO, 2005). Analysen auf molekularer Basis deuten darauf hin, dass resistente Stämme unabhängig voneinander in verschiedenen Orten der Erde entstanden sind: zwei in Südamerika, einer in Asien, einer in Papua Neu Guinea und einer auf den Philippinen (Chen *et al.*, 2003, Cortese *et al.*, 2002, Mehlotra *et al.*, 2001, Wootton *et al.*, 2002). Nach diesen Erkenntnissen wird die Verbreitung der CQ-Resistenz in Afrika nicht auf das Erscheinen eines neuen resistenten Stammes zurückgeführt, sondern vielmehr auf die langsame Ausbreitung von Südostasien her mit der endgültigen Ankunft in Ostafrika im Jahre 1978 (Wellems & Plowe, 2001).

Die Resistenz gegen ein Malaria-Medikament wird *in vitro* mittels IC_{50} -Werten gemessen, dem Wert, der – wie oben schon erwähnt – die Konzentration des Medikamentes widerspiegelt, bei welcher die Parasitämie um 50 % herabgesetzt wird. Der gleiche Parasitenstamm mit verschiedenen *pfert* Allelen aus verschiedenen geographischen Regionen transfiziert, variiert in seinen CQ IC_{50} -Werten und auch in seiner Reaktionen auf Verapamil (VP) (Henry *et al.*, 2006, Lakshmanan *et al.*, 2005, Sidhu *et al.*, 2002). Hierfür ist der genetische Hintergrund ausschlaggebend (Valderramos *et al.*, 2010). Die in PfCRT

auftretenden Mutationen variieren ebenfalls, einzige beständige Mutation ist die in den meisten CQ resistenten Stämmen konservierte Mutation K76T (Chen *et al.*, 2003, Cooper *et al.*, 2005, Sa *et al.*, 2009). Außerdem sind auch CQ resistente Fälle bekannt, in welchen an Position 76 ein Asparagin (N) oder ein Alanin (A) zu finden ist. Für beide Fälle konnte VP-reversible CQ-Resistenz nachgewiesen werden (Chaijaroenkul *et al.*, 2011, Huaman *et al.*, 2004).

Es gibt Untersuchungen, welche stark darauf hindeuten, dass der Erwerb einer CQ-Resistenz auf Kosten der Fitness geht (Hayward *et al.*, 2005, Mita *et al.*, 2004, Sanchez *et al.*, 2010). Durch Absetzen der CQ Behandlung kam es in Malawi zu einem Rückgang von CQ resistenten Parasiten (Laufer *et al.*, 2006), was jedoch auf die verstärkte Ausbreitung von CQ sensitiven Parasiten zurückzuführen war, welche sich gegenüber den resistenten durchsetzten (Laufer *et al.*, 2010).

In einer früheren Untersuchung zur CQ-Resistenz konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert in der NV (pH_{NV}) in engem Zusammenhang mit der Anfälligkeit der Parasiten gegen CQ steht (Yayon *et al.*, 1985). Man vermutete, dass CQ resistente Parasiten einen anderen pH_{NV} hätten als sensitive, und dadurch die Resistenz vermittelt würde. Verschiedene Studien stützten sogar diese Hypothese (Dzekunov *et al.*, 2000, Ursos *et al.*, 2000). Heute weiß man jedoch, dass der pH_{NV} sowohl in CQ resistenten als auch in sensitiven Parasiten etwa 5,2 beträgt (Hayward *et al.*, 2006, Kuhn *et al.*, 2007). Die Theorie, dass in CQ resistenten Parasiten sich weniger CQ in der NV anhäuft als in sensitiven, weil es aus der NV heraustransportiert wird, konnte durch eine ganze Reihe von Untersuchungen untermauert werden (Krogstad *et al.*, 1992, Krogstad *et al.*, 1987, Sanchez *et al.*, 2003, Bray *et al.*, 2006) und ist heute allgemein anerkannt.

CQ hat durch die Ausbreitung von Resistenzen in den endemischen Gebieten sehr an Wirksamkeit verloren (Okombo *et al.*, 2011), die Wirksamkeit von QN hingegen hat sich nicht sehr verändert. Resistenzen gegen QN sind nicht sehr weit verbreitet und treten in geringem Ausmaß in Afrika und Südostasien auf. Während CQ-Resistenz hauptsächlich durch PfCRT vermittelt wird, scheinen an der Ausbildung der Resistenz gegen QN außerdem noch weitere Transporter beteiligt zu sein: der “*Plasmodium falciparum* multidrug resistance transporter 1“ (PfMDR1) und der “*Plasmodium falciparum* sodium proton exchanger“ (PfNHE1) (Ferdig *et al.*, 2004). Mutationen in *pfmdr1* und dessen Anzahl an Kopien im Parasiten sind mit der QN-Resistenz in Verbindung gebracht worden, wobei eine geringere Anzahl an *pfmdr1* Kopien eine erhöhte Anfälligkeit gegen QN zur Folge hatte (Sidhu *et al.*,

2006, Sidhu *et al.*, 2005). PfnHE-1 enthält 3 Mikrosatelliten Regionen, wovon eine DNNND Wiederholungen aufweist. Hierbei steht die Anzahl der Genkopien dieser Wiederholungen in umgekehrtem Verhältnis zur Anfälligkeit für QN (Ferdig *et al.*, 2004). Das Zusammenspiel der verschiedenen Determinanten für die QN-Resistenz ist jedoch noch ungeklärt.

1.8. PfCRT

Chloroquin resistente (CQR) *P. falciparum* Stämme akkumulieren im Gegensatz zu CQ sensitiven (CQS) weniger CQ in der NV (Krogstad *et al.*, 1992, Krogstad *et al.*, 1987, Bray *et al.*, 2006), was durch VP umgekehrt werden kann (Krishnamurthy *et al.*, 2009). Durch ein genetisches Kreuzungsexperiment konnte dieses Phänomen mit *pfcr*t in Verbindung gebracht werden. In dieser Studie wurde aufgrund von Untersuchungen der Nachkommen aus einer Kreuzung zwischen dem CQS *P. falciparum* Stamm HB3 und dem CQR Stamm Dd2 ein Genort auf Chromosom 7 des Parasiten identifiziert, welcher dem Phänotyp der CQR Stamm entspricht (Fidock *et al.*, 2000, Wellems & Plowe, 2001). Auf diesem Genort befindet sich das “*Plasmodium falciparum* Chloroquin Resistenz Transporter”-Gen *pfcr*t, welches für das in der Membran der Nahrungsvakuole lokalisierte Transportprotein PfCRT kodiert. Polymorphismen innerhalb dieses Gens korrelieren vollständig mit der CQ-Resistenz in Parasiten aus diversen endemischen Gebieten (Fidock *et al.*, 2000). Die grundlegende Bedeutung von PfCRT für die Resistenz des Parasiten fand außerdem noch dadurch Bestätigung, dass CQS *P. falciparum* Stämme nach Transfektion mit CQR *pfcr*t eine leichte CQ-Resistenz entwickelten (Durand *et al.*, 2001, Sidhu *et al.*, 2002).

CQR *P. falciparum* Stämme besitzen im Vergleich zu CQS Stämmen zahlreiche Mutationen in *pfcr*t. Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, ist die Mutation K76T in *pfcr*t in fast allen CQ resistenten Stämmen konserviert. Durch die Umkehr dieser Mutation (T76K) fallen die entsprechenden IC₅₀-Werte für CQ und QN auf ein Niveau, das dem von CQS Stämmen gleicht, ein Beleg für die entscheidende Rolle dieser Aminosäureposition (Lakshmanan *et al.*, 2005). Auch wird die Verapamil Reversibilität der CQ-Resistenz auf K76T zurückgeführt (Lakshmanan *et al.*, 2005).

Der Angriffspunkt von CQ ist die NV (Yayon *et al.*, 1984), das Zellorganell, in dessen Membran PfCRT exprimiert wird. PfCRT vermittelter CQ Transport durch mutierte PfCRT Varianten aus der NV heraus stellt also die Grundlage der CQ-Resistenz dar (Roepe, 2009).

Hierfür gibt es jedoch zwei gegensätzliche Erklärungsmodelle. Das eine postuliert, dass PfCRT ein Kanal ist, der aufgrund der durch K76T eingebüßten positiven Ladung in resistenten Parasiten einen Auswurf des zweifach protonierten CQ entlang eines Protonengradienten an der NV-Membran ermöglicht, was in sensitiven Parasiten durch K76 verhindert wird (Warhurst *et al.*, 2002, Bray *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2004). VP stellt die positive Ladung wieder her und sensibilisiert dadurch resistente Stämme gegen CQ. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Transportmechanismus für CQ durch PfCRT energieabhängig, VP-sensitiv und substratspezifisch ist (Sanchez *et al.*, 2005, Sanchez *et al.*, 2004, Sanchez *et al.*, 2007b). Aus diesem Grund besagt ein gegensätzliches Modell, dass PfCRT vielmehr einen Transporter ist, dessen Substrat-Affinität durch Mutationen verändert wird. Untersuchungen haben gezeigt, dass PfCRT vermittelter Transport mit CQ, QN, QD und AQ trans-stimuliert werden kann (Sanchez *et al.*, 2007a, Sanchez *et al.*, 2003), was ebenfalls gegen die Kanal-Hypothese spricht. Vergleichende mathematische Analysen der zwei Modelle (Chinappi *et al.*, 2010) und auf Oozyten basierende Studien der kinetischen Eigenschaften von PfCRT stützen die Transporter-Hypothese (Martin *et al.*, 2009b, Summers & Martin, 2010). Weitere Analysen haben in CQR Stämmen einen erhöhten CQ abhängigen Protonenfluss aus der NV heraus gezeigt, welcher durch gegen CQ resensibilisierende Substanzen umgekehrt werden konnte (Lehane & Kirk, 2008, Lehane & Kirk, 2010). Zusammenfassend untermauern diese Daten das Transporter Modell für PfCRT und deuten auf einen Cotransport von CQ mit Protonen hin (Sanchez *et al.*, 2007b).

PfCRT besteht aus 424 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 45 kDa (Sanchez *et al.*, 2010). Die Phosphorylierung des Threonins an Position 416 ist mit daran beteiligt, PfCRT zur Membran der NV zu dirigieren (Kuhn *et al.*, 2010), wo es bioinformatischen Analysen zufolge mit 10 transmembranen Domänen lokalisiert ist, N- und C-Termini dem Zytoplasma zugewandt (Abbildung 1.6.). Das Protein wird der “drug-metabolite-transporter“ Superfamilie zugeordnet (Martin & Kirk, 2004). Die transmembrane Topologie weist eine Pseudo-Symmetrie auf, welche für viele dieser Superfamilie zugehörigen Transporter typisch ist (Sanchez *et al.*, 2010) und unterstützt somit zusätzlich das Transporter-Modell.

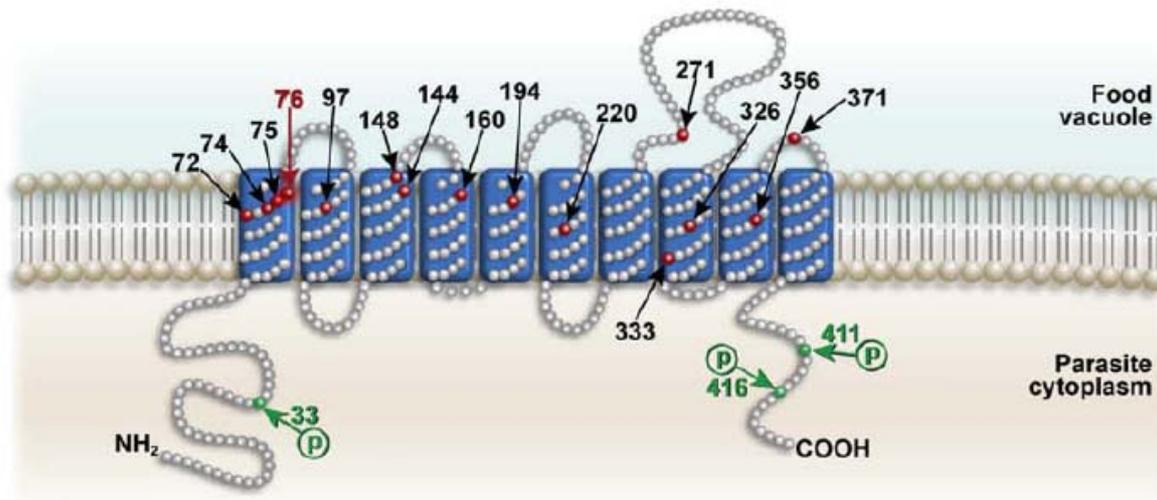


Abbildung 1.6.: Putative Membrantopologie von PfCRT

Die Transmembrandomänen sind in blauen Kästchen hervorgehoben. Polymorphe Aminosäuren sind rot dargestellt, deren jeweilige Position innerhalb des Proteins ist durch die Nummerierung an den Pfeilen gekennzeichnet. Grüne Pfeile mit entsprechender Nummerierung kennzeichnen mögliche Phosphorylierungsstellen (Quelle: Sanchez *et al.*, 2010).

Die Frage nach dem natürlichen Substrat für PfCRT ist nach wie vor ungeklärt. In Untersuchungen von R. E. Martin und Kollegen mit *X. laevis* Oozyten konnte gezeigt werden, dass organische Aminosäuren beinhaltende kleine Peptide, nicht aber einzelne Aminosäuren, Di- oder Tripeptide die PfCRT vermittelte CQ Aufnahme unterbinden. Ein direkter Transport durch PfCRT^{Dd2} konnte für das radioaktiv markierte Peptid YPWF-NH₂ gezeigt werden (Martin *et al.*, 2009b). Dies deutet darauf hin, dass PfCRT den Transport kleiner Peptide, welche vermutlich der Hämoglobin Degradation in der NV entstammen, aus der NV heraus ins Zytoplasma vermittelt. Dies bleibt aber fraglich, da die genannten Ergebnisse nicht mit der HB3 Variante von PfCRT erzielt werden konnten.

Eine andere Studie mit *X. laevis* Oozyten als Expressionssystem hat gezeigt, dass ein zu PfCRT homologes Protein aus *Arabidopsis thaliana*, CLT ("CRT like transporter"), den Transport von Glutathion vermittelt (Maughan *et al.*, 2010). Allerdings gibt es bislang keinen Nachweis für PfCRT vermittelten Transport von Glutathion, obgleich der Glutathion-Metabolismus in der Vergangenheit mit der CQR in Verbindung gebracht worden ist (Meierjohann *et al.*, 2002).

Untersuchungen von R. E. Martin mit *X. laevis* Oozyten haben gezeigt, dass der PfCRT^{Dd2} vermittelte CQ Transport durch Amodiaquin, Chinin, Chinidin, Quinacrin und Verapamil sowie Primaquin und Mefloquin gehemmt werden kann (Martin *et al.*, 2009a). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass PfCRT einen Einfluss auf Veränderungen in der Anfälligkeit für

Amodiaquin, Chinin, Chinidin, Amantadin und Halofantrin hat (Cooper *et al.*, 2002, Cooper *et al.*, 2007, Ferdig *et al.*, 2004, Fidock *et al.*, 2000, Sa *et al.*, 2009, Sidhu *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass PfCRT nicht nur auf den Transport von CQ beschränkt ist.

In der Entwicklung modifizierter CQ-analoger Substanzen als potentielle Malaria-Medikamente (Zishiri *et al.*, 2011) ist es unerlässlich, die Interaktion zwischen PfCRT und diesen Substanzen zu verstehen. Da außerdem Wirkstoffe wie Amodiaquin und Chinin, die den Wirkmechanismus von CQ teilen, nach wie vor im Einsatz gegen Malaria sind, bleibt das Studium der Transporteigenschaften und Transportmechanismen von PfCRT ein wichtiger Bestandteil der Malariaforschung. Bei einer *in situ* Untersuchung wären zu viele Faktoren innerhalb des Systems zu berücksichtigen, wodurch die Analyse des PfCRT vermittelten Transports erschwert würde. Aus diesem Grund ist die Expression des Proteins in einem heterologen Expressionssystem eine vielversprechende Alternative zur gezielten Untersuchung.

1.9. *Xenopus laevis* Oozyten als heterologes Expressionssystem

Der mehrfach ausgezeichnete Entwicklungsbiologe J. B. Gurdon zeigte erstmals anhand molekularbiologischer Untersuchungen, dass in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *X. laevis* eingebrachte Fremd-mRNA effizient exprimiert wird, nachdem durch das Injizieren von für Kaninchen-Globin kodierender mRNA das entsprechende Protein in Oozyten synthetisiert werden konnte (Gurdon *et al.*, 1971). Gurdon führte somit *X. laevis* Oozyten als wissenschaftliche Forschungsmethode ein (Brown, 2004, Kashiwagi *et al.*, 2010). Diese Technik wurde noch verbessert, als Douglas Melton eine Methode zur *in vitro*-Synthese von RNA etablierte (Krieg & Melton, 1984). Es folgten eine Reihe von Studien mit *X. laevis* Oozyten als heterologes Expressionssystem. Hediger und Kollegen wiesen die Expression des Na⁺-abhängigen Kaninchen-Glucosetransporters in Oozyten nach (Hediger *et al.*, 1987a, Hediger *et al.*, 1987b), Gould und Kollegen sowie Vera und Kollegen führten funktionelle Analysen an Glucosetransportern von Säugetieren durch (Gould & Lienhard, 1989, Vera & Rosen, 1989).

Heute nehmen *X. laevis* Oozyten mit ihrem weiten Spektrum an Anwendungsgebieten einen festen Platz in der wissenschaftlichen Forschung ein (Brown, 2004, Miller & Zhou, 2000). Sie finden ihre Anwendung vor allem in der Studie von membranständigen Proteinen wie Kanälen und Transportern, welche in der Plasmamembran der Oozyte exprimiert werden.

Der große Vorteil dieses Expressionssystems liegt in der einfachen Handhabung. Die Oozyten haben einen Durchmesser von etwa 1 mm und sind somit relativ groß, was das Einbringen von Fremd-mRNA durch Mikroinjektion sehr einfach macht. Außerdem müssen sie nicht unter sterilen Bedingungen gehalten werden. Des Weiteren verfügen sie über die Fähigkeit, Proteine posttranslational zu modifizieren (Lane *et al.*, 1983), eine wichtige Eigenschaft für die Studie von Membranproteinen.



Abbildung 1.7.: Weiblicher *X. laevis* (links) und dessen Oozyten nach operativer Entnahme (rechts)
(Quelle: *Xenopus-express*, XLAB)

In einer nicht allzu weit zurückliegenden Arbeit ist es R. E. Martin und Kollegen gelungen, durch Expression einer modifizierten Variante von PfCRT in *X. laevis* Oozyten funktionelle Studien mit CQ durchzuführen und zu zeigen, dass CQR aufgrund des unmittelbaren CQ-Transports durch PfCRT vermittelt wird (Martin *et al.*, 2009b). Außerdem sind noch weitere membranständige Transporter von *P. falciparum* mit diesem Expressionssystem untersucht worden: Der in der Nahrungsvakuole lokalisierte Resistenztransporter PfMDR1 (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1) (Sanchez *et al.*, 2008), die Calcium-ATPase PfATP6 (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003), der mitochondriale $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Austauschher PfCHA1 (Rotmann *et al.*, 2010), der Hexose Transporter PfHT1 (Krishna & Woodrow, 1999) und der Na^{+} -Abhängige Transporter für anorganisches Phosphat PfPiT (Saliba *et al.*, 2006).

Die Expression von PfCRT in *X. laevis* Oozyten stellt also eine vielversprechende Methode dar, um die Fragestellungen innerhalb dieser Arbeit anzugehen. Abbildung 1.7. zeigt ein weibliches Exemplar von *X. laevis* und dessen Oozyten nach operativer Entnahme und Kollagenase-Behandlung

1.10. Zielsetzung der Arbeit

In der Vergangenheit sind eine Vielzahl von Studien durchgeführt worden, worin die Bedeutung von PfCRT für die Ausbildung der Resistenz gegen CQ und QN untersucht wurde. Ferdig und Kollegen haben PfCRT als einzige Hauptdeterminante zur Vermittlung von CQR identifiziert (Fidock *et al.*, 2000). Die Ausbildung der Resistenz gegen QN hingegen erfordert zusätzlich zu PfCRT noch weitere Faktoren: den **PfMDR1** (“*Plasmodium falciparum* multidrug resistance transporter“) und den **PfNHE1** (“*Plasmodium falciparum* sodium proton exchanger“) (Ferdig *et al.*, 2004).

In verschiedenen Studien ist der Zusammenhang zwischen PfCRT und der Resistenz von *P. falciparum* gegen Chinoline untersucht worden. Man hat die IC₅₀-Werte für bestimmte Wirkstoffe in Parasiten gemessen, die mit mutierten *pfcr*t transfiziert worden waren, um Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen bestimmten Mutationen und Resistenz zu ziehen (Fidock *et al.*, 2000, Sidhu *et al.*, 2002). Untersucht wurde außerdem, inwieweit andere Gene Einfluss auf die Resistenz gegen Chinoline haben (Ferdig *et al.*, 2004, Mu *et al.*, 2003). Auch ist eine Reihe von Studien unternommen worden, in denen kinetische Eigenheiten von PfCRT vermitteltem Transport von Chinolinen in Parasitenstämmen untersucht worden sind (Sanchez *et al.*, 2004, Sanchez *et al.*, 2007a, Sanchez *et al.*, 2003).

Um die Funktionsweise des Proteins, PfCRT, gezielt untersuchen zu können, muss es in einem heterologen Expressionssystem exprimiert werden. Dadurch kann eine zielgerechte Untersuchung außerhalb des *in vivo* Gesamtumfeldes erfolgen. Für die experimentellen Analysen von PfCRT wurden *X. laevis* Oozyten als heterologes Expressionssystem gewählt. Die Vorteile dieses Systems sind im vorigen Abschnitt (Abschnitt 1.9.) erläutert.

Ziel dieser Arbeit war besseres Verständnis für die transportmechanistischen Interaktionen zwischen PfCRT und den untersuchten Substraten CQ, QN und QD zu gewinnen. Dafür wurde zunächst untersucht, ob CQ und QN an unterschiedlichen Substratbindetaschen in PfCRT binden. Anschließend wurde durch gezielte Mutagenese in PfCRT die Bedeutung verschiedener Aminosäurepositionen für die Transportaktivität des Proteins überprüft. Als erstes wurde der Einfluss der wichtigen Aminosäure 76 genauer unter die Lupe genommen, danach die übrigen 7 Aminosäuren, die sich in PfCRT^{HB3} und PfCRT^{Dd2} unterscheiden. Dadurch sollte die Bedeutung der Aminosäuren für den Transport und als Bestandteil der Substratbindetaschen besser verstanden werden.

2. Material und Methoden

Ein Großteil der in diesem Kapitel beschriebenen Methoden sind dieselben, wie jene, welche innerhalb der von mir ebenfalls in der hiesigen Abteilung fertig gestellten Diplomarbeit (Bellanca, 2008) angewendet wurden. Da es sich um die Beschreibung von identischen, zumeist schon etablierten Methoden handelt und der Schreibstil sehr unter einer Umformulierung gelitten hätte, wurde der Text nicht immer komplett abgeändert.

2.1. Material

2.1.1. Laborausstattung

Autoklav	Tuttnauer Systec, 2540
B-Strahlen-Zähler	LS 6000IC, Beckman
Brutschrank für Oozyten	Memmert
Bunsenbrenner	WLD-TEC
Dosiergeräte	Pipetman, P2, P20, P200, P1000, Gilson
Eismaschine	Scotsman, AF 30
Elektroporationsgerät	Easyject Prima, EquiBio
Feinwaage	SCALTEC, Mild Waagen-Zentrum Mannheim GmbH
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus GmbH, Hanau
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach
Gel-Apparaturen	Biorad, Mini-Sub [®] Cell GT Feinmechanik-Werkstatt, Zoologisches Institut Heidelberg
Heizblöcke	Digi-Block JR, Laboratory devices INC, USA neoBlock 1, 2-2503, neoLab
Injektor	Drummond „NANOJECT“, Helmut Saur Laborbedarf
Inkubationsschrank (Bakterien)	Function line, Hereaus Instruments
Kamera	DC120 Zoom Digital Camera, Kodak, NY
Kapillarziehmaschine	Model P-87 Flaming / Braun Micropipette Puller, Sutter Instrument Co.
Kühlschränke	Liebherr, Biberach
Magnetheizrührer	IKAMAG RH, Janke & Kunkel Labortechnik MR 3001, Heidolph

Mikromanipulator	Drummond, Bachofer Reutlingen
Mikrowellengerät	AGE, BOSCH
Netzgeräte Power-Supply	Power Pac 200, Biorad Elektrophoresis Power Supply, EPS 601 Amersham Pharmacia
PCR-Maschinen	T gradient Thermoblock, Biometra PCR System 9701, GeneAmp
pH-Meter	inoLAB, WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Stripettor, Costar
Quarz-Küvetten	Präzisionsküvetten aus Quarzglas suprasil [®] , Hellma
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Innova 4300
Spektrophotometer	UVIKON 923, KONTRON INSTRUMENTS
Sterile Werkbank	ClassII Type A, The Baker Company, USA
Stoppuhr	Roth
Tischzentrifugen	MC13, MILLIPOREs Biofuge pico, Hereaus Sepatech Biofuge fresco, Kendro
UV-DNA Linker	GS GWENE LINKER, Bio-Rad
UV-Handlampe	M & S Laborgeräte GmbH
UV-Transluminator	TFX-35M, Life Technologies
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Waage	MC1, Laboratory LC 2200 P
Wasserbad	Julabo 7A, Julabo
Zentrifugen	RC 5B Plus, SORVALL J2-MC, Beckman
Ultrazentrifuge	RC M120 GX, SORVALL

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Chirurgisches Nahtmaterial	Safil [®] , Aesculap AG & Co KG
Einmalhandschuhe (Latex / Nitril)	Hartmann, Heidenheim
Elektroporationsküvetten	BIO RAD, Gene Pulser [®] , <i>E. coli</i> Pulser [™] Cuvette
Filmmaterial	Kodak
Glasskapillaren	3,5 Drummond # 3-000-203-G/X Helmut Saur Laborbedarf
Küvetten (Plastik)	Sarstedt, Nümbrecht

Parafilm	American International Can, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	Corning Incorporation, Bodenheim
Pipettierspitzen	Corning Inc, Bodenheim
Petrischalen, Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polyvinylidendifluorid-Membran	Immun-Blot PVDF Membran, Biorad
Reaktionsgefäße 15 mL, 50 mL	
Reaktionsgefäße 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe-Lock 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten	Corning Incorporation, Bodenheim
Sterilfilter 0,2 und 0,5 µm	Schleicher & Schuell, Einbeck Millipore, 0,2 µm
Szintillationsgefäße 6 mL	Zinsser, Frankfurt

2.1.3. Chemikalien

2.1.3.1. Allgemeine Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Boehringer JT Baker, Roche Molecular Biochemicals, Calbiochem-Novabiochem GmbH, cc Pro, Fluka, Gibco Invitrogen, ICN Biomedicals, Molecular Probes, Packard Canberra Bioscience Company, Riedel-de-Haen, Carl Roth GmbH, Sigma Chemie, MP Biomedicals, Inc. Nicht-radioaktive Medikament-Wirkstoffe (Chloroquine Disphosphate, Chinin Hydrochlorid, Chinidin Sulphat, Verapamil Hydrochlorid) wurden von Sigma bezogen.

2.1.3.2. Radioaktiv markierte Chemikalien

[³ H]-Chloroquin	25 Ci/mmol	Amersham Radiolabelled chemicals
[³ H]-Chinin	20 Ci/mmol	Amersham Radiolabelled chemicals
[³ H]-Chinidin	20 Ci/mmol	Amersham Radiolabelled chemicals

2.1.4. Puffer, Medien und Lösungen

Ampicillin-Stock Lösung	100 mg/mL Ampicillin in ddH ₂ O steril filtriert, bei -20°C gelagert	100 mg/mL
APS (10 %)	1 g APS auf 10 mL mit H ₂ O auffüllen	

Material und Methoden

Betäubungslösung	Ethyl 2-aminobenzoate methan sulfonat in Leitungswasser	0.1 % (w/v)
Blockier-Lösung (Western Blot)	5 g Milchpulver 100 mL 1x PBS	5 %
Bromphenolblau-Lösung (1 %)	0,1 g auf 10 mL mit H ₂ O auffüllen	
Coomassie Entfärbelösung	100 mL Essigsäure 50 mL Methanol auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	
Coomassie Färbelösung	0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 50 mL Essigsäure 25 mL Methanol auf 500 mL mit H ₂ O auffüllen	
Ethidiumbromidlösung	1 %ige Lösung in Wasser (10 mg/mL) Homidiumbromid, 3,8-Diamino-5-Ethyl-6-Phenylphenanthridinium-Bromid	
Glukose-Lösung	360 g α -D-Glukose / L in ddH ₂ O steril filtriert, bei -20°C gelagert	2 M
HEPES (pH 7,5)	238,3 g HEPES in 1 L ddH ₂ O pH mit NaOH eingestellt, autoklaviert	1 M
KCl-Lösung	74,56 g KCl in 1 L ddH ₂ O, autoklaviert	1 M
DNA Gel Ladepuffer (6x)	Bromphenolblau Xylemcyanol FF Ficoll (Type 400) in ddH ₂ O bei 4°C gelagert	0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v) 15 % (w/v)
LB-Agarplatten	10 g Trypton-Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Bacto Agar in 1 L ddH ₂ O, autoklaviert	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1 % (w/v) 1,5 % (w/v)
LB-Medium	10 g Trypton-Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl in 1 L ddH ₂ O, autoklaviert	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1 % (w/v)
MES (pH 6,5)	195,24 g MES in 1 L ddH ₂ O pH mit HCl eingestellt, autoklaviert	1 M
MgCl ₂ -Lösung	203,3 g MgCl ₂ in 1 L ddH ₂ O, autoklaviert	1 M
NaCl-Lösung	234 g NaCl in 1 L ddH ₂ O, autoklaviert	4 M
ND96	OR2 + 1,8 mM CaCl ₂ 2 mL Pen-Strep/L ND96	

Material und Methoden

Natriumphosphat (1 M) (NaPi)	5,52 mL H ₃ O ₄ P 90 mL H ₂ O Mit NaOH auf pH 7,4 einstellen mit H ₂ O auf 100 mL auffüllen	(85 % \pm 18,1 M)
Oozyten Lyse Puffer	150 mM NaCl 1 mM EDTA 100 mM Tris HCl, pH 7,2 mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, danach dazugeben: 1 % Triton X 100 1 % Na-deoxycholat 0,1 % SDS 400 μ L Proteaseinhibitor Coctail (25x) auf 10 mL mit H ₂ O auffüllen	
OR2	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES pH 7,5 in ddH ₂ O, autoklaviert, bei 4°C gelagert	
PBS (1x)	5 PBS-Tabletten auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	1x
PBS (1x) (+ Tween)	5 PBS-Tabletten 1000 μ L Tween-20 auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	1x 0.1 %
Pipes Puffer	0,5 M Pipes in NaOH	
Proteaseinhibitor Coctail (25x)	1 Tablette/2 mL H ₂ O aliquotieren und bei -20°C einfrieren	
SDS (10%)	10 g SDS Pulver auf 100 mL mit H ₂ O auffüllen	
SDS-Gel Ladepuffer	250 μ L Tris, pH 6,8 (1 M) 300 μ L SDS (10 %) 200 μ L Glycerin 1 μ L Bromophenolblau-Lösung (1 %) 30 μ L β -Mercaptoethanol (frisch zugeben) 40 μ L Proteaseinhibitor Coctail (25x) (frisch zugeben) auf 1 mL mit H ₂ O auffüllen	250 mM 3 % (v/v) 20 % (v/v) 0,001 % (v/v) 3 % (v/v)
SDS-Gel Laufpuffer (1x)	100 mL Tris-Glycine Puffer (10x) 10 mL SDS (10%ig) auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	25 mM Tris, 190 mM Glycine 0.1 % (w/v)
Semi-dry Transfer Puffer	48 mM Tris 39 mM Glycine 0.38 % (w/v) SDS	

Material und Methoden

SOB-Medium	20 g Trypton-Pepton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 5 g MgSO ₄ *7H ₂ O in 1 L ddH ₂ O, autoklaviert	2 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,5 % (w/v)
SOC-Medium	10 mL SOB-Medium 100 µL 2M Glukose	20 mM
Stripping Puffer	3,125 mL 1 M Tris pH 6.8 10 mL 10 % SDS 350 µL 2-Mercaptoethanol auf 50 mL mit H ₂ O auffüllen	62,5 mM Tris pH 6.8 2 % SDS 100 mM β-Mercaptoethanol
Super-Broth-Medium (SB-Medium)	32 g Trypton-Pepton 20 g Hefeextrakt 5 g NaCl 7 mL 1 N NaOH in 1 L ddH ₂ O	3,2 % (w/v) 2 % (w/v) 0,5 % (w/v) 7 mM
TAE Puffer (50x)	242 g Tris-HCl 57,1 mL Eisessig 100 mL 0,5 M EDTA-Na pH 8,0 ad 1 L ddH ₂ O, bei RT aufbewahrt	
TB Puffer	10 mM Pipes Puffer 55 mM MnCl ₂ 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl Alle Substanzen bis auf MnCl₂ in H₂O lösen und mischen, pH mit KOH auf 6,7 einstellen, anschließend MnCl₂ zugeben und steril filtrieren	
TEMED	99 %ige Lösung	
Acrylamid	30 %ige Lösung	
Trichine (pH 8,5)	179,17 g Tricine in 1 L ddH ₂ O pH mit NaOH eingestellt, autoklaviert	1 M
Tris (1 M, pH 6,8)	60,5 g Tris Base in 400 mL H ₂ O lösen pH 6,8 mit 37 %iger HCl einstellen mit H ₂ O auf 500 mL auffüllen	
Tris (1,5 M, pH 8,8)	60,5 g Tris Base in 400 mL H ₂ O lösen pH 8,8 mit 37 %iger HCl einstellen mit H ₂ O auf 500 mL auffüllen	
Tris-Glycine Puffer (10x)	60,40 g Tris 288,00 g Glycin auf 2 L mit H ₂ O auffüllen	
Verdünnungs-Puffer (für Antikörper)	1 g BSA 100 mL PBS	1 % (w/v)

2.1.5. Molekularbiologische Kits

Enhanced Chemiluminescence Kit	Pierce [®] , U.S.A.
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
HiSpeed Plasmid Maxi Kit QIAGEN, Hilden	Qiagen
mMESSAGE mMACHINE [®] Kit	Ambion
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen
QIAGEN PCR Purification Kit QIAGEN, Hilden	Qiagen

2.1.6. Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen New England BioLabs GmbH, Stratagene Europe, Invitrogen BV und Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH bezogen.

2.1.7. Größenmarker und Ladepuffer

Größenmarker 1 kb-DNA ladder	Fermentas und New England BioLabs
Größenmarker 1 kb plus-DNA ladder	Fermentas
Größenmarker 100 bp-DNA ladder	New England BioLabs
6x Ladepuffer	Fermentas

2.1.8. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Thermo Fisher Scientific GmbH bezogen. Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang aufgeführt (Abschnitt 7.2.)

2.1.9. Vektoren

Für die Expression der verschiedenen PfCRT Varianten in Oozyten wurde der Expressionsvektor pSP64T verwendet (Melton *et al.*, 1984). Dieser Vektor enthält in seiner ursprünglichen Form in der multiplen Klonierungsstelle (MCS) eine untranslatierte 5'- und 3'- β -Globin-Sequenz, welche zu einer verbesserten Stabilität der *in vitro* transkribierten cRNA in Oozyten beitragen und von einer Bgl II Restriktionsschnittstelle getrennt werden (Abbildung 2.1.). Die Bgl II Schnittstelle wurde mittels gezielter Mutagenese durch die Schnittstellen Xho I und Avr II ersetzt (in 5' nach 3' Richtung), wodurch gewährleistet wurde, dass DNA-Fragmente mit der jeweils gewünschten kodierenden Sequenz nur in der richtigen Orientierung eingefügt werden konnten (Abbildung 2.2.). Weiterhin besitzt der

Vektor einen SP6-Promotor, der vor der MCS liegt, ein Resistenzgen gegen Ampicillin und eine Ori-Stelle (origin of replication). Restriktionsenzyme, die in der MCS schneiden, können zur Linearisierung des Vektors für die *in vitro* Transkription genutzt werden.

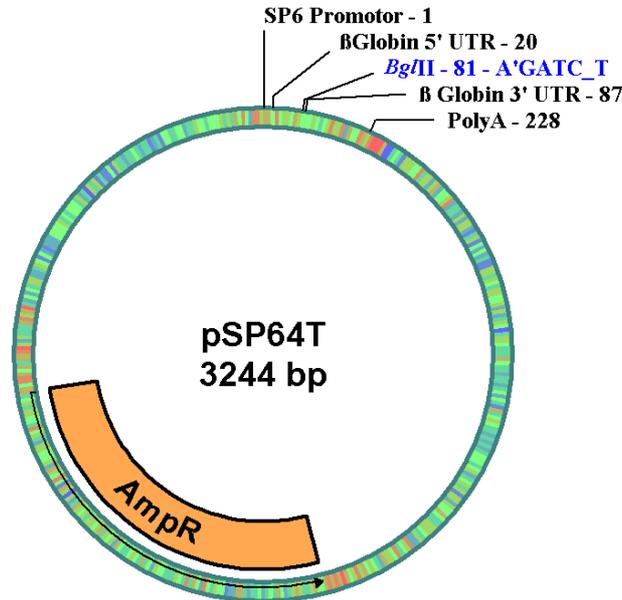


Abbildung 2.1.: Plasmidkarte des Expressionsvektors pSP64T.

Der Expressionsvektor pSP64T in seiner ursprünglichen Form mit der Bgl II Schnittstelle in der MCS zwischen den 5' und 3' Globin-Sequenzen.

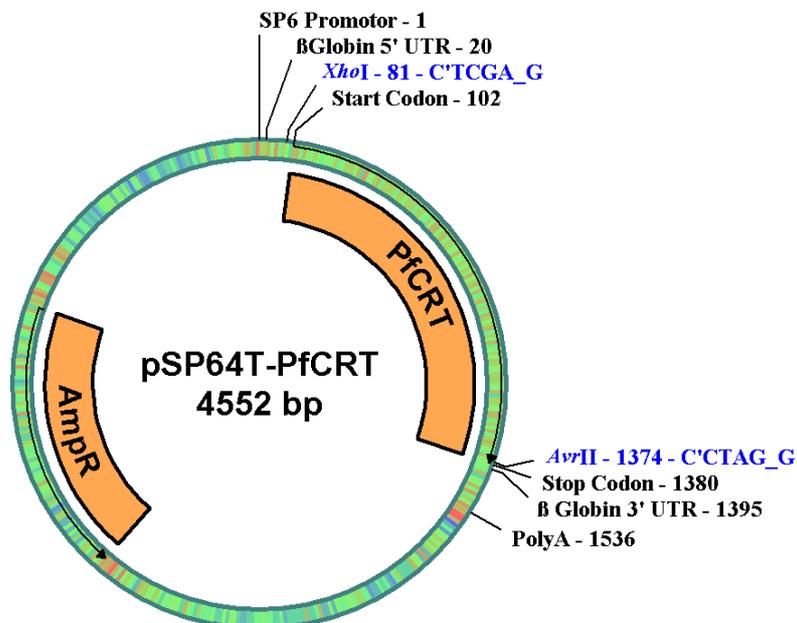


Abbildung 2.2.: Das Konstrukt pSP64T-PfCRT

Das eingefügte DNA-Fragment *pfcr*t steht für eine Vielzahl von verschiedenen Varianten des Proteins. Die kodierende Sequenz wurde mit den Restriktionsenzymen Xho I und Avr II herausgeschnitten.

2.1.10. Bakterienstämme

Für die Transformationen (Abschnitt 2.2.2.2.) wurden elektrokompetente Zellen der *Escherichia coli*-Stämme PMC103 und chemokompetente Zellen der Stämme XL1-Blue verwendet.

2.1.11. Antikörper

Anti-PfCRT (Polyklonal, aus Meerschweinchen)

Anti- α -Tubulin (Monoklonal, aus Maus) Sigma

Anti-Meerschweinchen-POD (Monoklonal, aus Esel) Jackson Immunoresearch

Anti-Kaninchen-POD (Monoklonal, aus Ziege) Jackson Immunoresearch

2.1.12. Tierstämme und Oozyten

Südafrikanische Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) wurden von der Firma NASCO in den U.S.A bezogen und in den dafür vorgesehenen Räumlichkeiten des Interfakultären Biomedizinischen Forschungszentrums (IBF) der Universität Heidelberg in Aquarien mit einer Wassertemperatur von 18°C gehalten. Sie wurden wöchentlich 3 mal mit Futterpellets gefüttert. Bei Lieferung betrug das Alter der Frösche 2 Jahre.

2.1.13. Software

BioEdit DNA-, RNA- und Proteinsequenzvergleiche
(Tom Hall, Ibis Biosciences, copyright © 1997-2007)

Excell Tabellenkalkulation
Microsoft Corporation

pDRAW Erstellen von Plasmidkarten
→ frei erhältlich (AcaClone-software)

SigmaPlot11 Statistische Auswertungen und Berechnungen
Systat Software, Inc.

Word Textverarbeitung
Microsoft Corporation

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Elektrophorese von DNA und RNA in Agarosegelen

Präparative sowie analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe von 1 %igen Agarose-Gelen durchgeführt. Hierzu wurde die Agarose in TAE-Puffer aufgeköcht und hinterher auf etwa 50°C heruntergekühlt, um das hitzempfindliche Ethidiumbromid hinzugeben zu können. Es wurden 3,3 µL Ethidiumbromid in 50 mL abgekühlte Agarose-Gel Lösung pipettiert, welche anschließend in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen wurde. Nach Polymerisation der Agaroselösung wurde der Kamm vorsichtig entfernt, der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1 %igem TAE-Puffer bedeckt.

Zur Analyse von *in vitro* transkribierter cRNA wurden 0,28 g LE Agarose (FMC bioproducts) in 2 mL 20x RNA-Laufpuffer und 30 mL ddH₂O durch Aufkochen gelöst, abgekühlt und 0,5 µL Ethidiumbromid hinzupipettiert. Die polymerisierte Agarose im Gelschlitten wurde mit 8 mL Formaldehyd (unter dem Abzug!!!) bedeckt, welches nach 1 Minute wieder abpipettiert wurde. Der Schlitten mit dem Gel wurde in eine Laufkammer gesetzt und mit Laufpuffer bedeckt.

Zur Auftrennung der negativ geladenen DNA bzw. RNA wird ihre Eigenschaft genutzt, im elektrischen Feld je nach Größe des Fragments unterschiedlich schnell durch das Gel zu wandern. Aufgrund des konstanten Verhältnisses Ladung : Masse der DNA bzw. RNA ist ihre Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht. Mit Hilfe von Agarosegelen kann man einige 100 bis mehrere 1000 Basenpaare, abhängig von der Agarose-Konzentration, voneinander auftrennen. Es wurden immer 1 %ige Agarosegele verwendet.

Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden mit einem Ladepuffer (6x) in die durch den Kamm entstandenen Taschen im Gel vorsichtig hineinpipettiert. Anschließend wurden die DNA- / RNA-Fragmente durch das Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung des positiven Pols – abhängig von ihrem Molekulargewicht mehr oder weniger schnell – gezogen und so nach Größe aufgetrennt. Um die Größe der Fragmente abschätzen zu können wurde bei jeder Agarosegel-Elektrophorese zusätzlich neben den Proben ein Marker mit bekannter Größe der darin enthaltenen Fragmente aufgetragen.

2.2.1.2. DNA-Extraktion

Gelextraktion von DNA

Um ein bestimmtes DNA-Fragment aus einem Agarose-Gel zu extrahieren, wurde dieses zunächst elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.2.1.1.). Unter Beleuchtung mit einer UV-Handlampe mit schwacher UV-Intensität wurde das gewünschte Fragment mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten. Wurden verschiedene Fragmente herausgeschnitten, musste das Skalpell zwischen jedem Herausschneiden kurz mit Wasser abgespült werden, um das Vermischen der verschiedenen Fragmente zu verhindern. Das jeweilige herausgeschnittene Gelstück wurde in ein 15 mL Reaktionsgefäß gegeben und das Gewicht ermittelt. Die Extraktion wurde mit Hilfe des QIAquick Gel extraction Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

Phenolextraktion und anschließende Alkoholfällung von DNA

Zu einem zuvor über Nacht mit Restriktionsendonukleasen behandelten Ansatz von 200 μ L wurden weitere 200 μ L eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamyl-Alkohol (Verhältnis 25:24:1) hinzupipettiert. Nachdem der Ansatz gut gemischt (vortexen) und zentrifugiert worden war (4 Minuten, 4000 rpm), wurde eine klare Phasenverteilung (3 Phasen) sichtbar. DNA in der oberen Phase, Proteine in der mittleren und Fette in der unteren. Es wurden \sim 160 μ L aus der oberen Phase entnommen, in ein sauberes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 8 μ L einer 4 M NaCl-Lösung (0,2 M Endkonzentration) und mit 400 μ L (doppeltes Volumen der DNA-Lösung) 100 %igem, reinem, eiskaltem Ethanol für 1 Stunde bei -80°C gefällt. Durch das einfach geladene Salz fällt die DNA durch Alkohol spontan aus, was durch die niedrige Temperatur noch unterstützt wird. Dieses Phänomen wird zur Anreicherung und Aufreinigung von DNA-Lösungen genutzt da Salze und andere wasserlösliche Substanzen gelöst bleiben. Nach einer Stunde wurde die Lösung zentrifugiert (30 Minuten, 13000 rpm) und die gefällte DNA mit 1 mL 70 %igem, reinem, eiskaltem Ethanol wieder für 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen.

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

Plasmide sind doppelsträngige, geschlossene, helikale Ringe, die nach alkalischer Denaturierung – im Gegensatz zu chromosomaler DNA der Bakterien – noch verbunden bleiben. Dies ermöglicht eine schnellere Renaturierung der Plasmid-DNA. Diese Eigenschaft

von Plasmid-DNA macht es möglich, sie von chromosomaler Bakterien DNA mit entsprechenden alkalischen Puffern zu trennen.

Aufgrund dieser Eigenschaft wird die Plasmid-DNA nach Zugabe des Renaturierungspuffers gelöst, wohingegen genomische DNA und ausgefällte Proteine abzentrifugiert werden können.

Die DNA wurde je nach Notwendigkeit in großen (Maxi-Präparationen) oder kleinen (Mini-Präparationen) Mengen isoliert. Hierfür wurde ein jeweils entsprechendes Kits (HiSpeed Plasmid Maxi Kit von Quiagen für eine Maxi-Präparation bzw. High Pure Plasmid Isolation Kit von Roche für eine Mini-Präparation) verwendet. Die jeweilige Präparation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.3. *In vitro*-Synthese von cRNA

Der die zu transkribierenden codierende Sequenz enthaltende pSP64T-Vektor wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym Pst I linearisiert (Abschnitt 2.2.1.6.). Die Plasmid-DNA wird dadurch in der MCS mit einem 5'-Überhang geschnitten (ein glattes Ende wäre ebenso geeignet), wodurch vermieden wird, dass ein überhängendes 3'-Ende als Erkennungsstelle für die RNA-Polymerase dient. Dies würde nämlich zur Synthese von gegenläufiger ("antisense") RNA führen (Goldin, 1992, Goldin & Sumikawa, 1992).

Mittels Phenolextraktion und anschließender Alkoholfällung wurde anschließend die linearisierte Plasmid-DNA aufgereinigt und als Vorlage für die RNA-Synthese verwendet. Diese wurde mit Hilfe des mMESSAGE mMACHINE[®] Kits nach Angaben des Herstellers (Ambion) durchgeführt. Folgende Reagenzien wurden bei RT in dieser Reihenfolge in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben:

- 2x NTP / CAP	10 µL
- steriles, Nuklease-freies H ₂ O	1 µL
- linearisierte DNA (0,2 µg/µL)	5 µL
- 10x Reaktions Puffer	2 µL
- Enzym Mix	2 µL

Der Ansatz wurde gut gemischt (durch Auf- und Abpipettieren), herunterzentrifugiert und dann für zwei bis drei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 µL Dnase I (2 U/µL) hinzupipettiert, gemischt und wieder abzentrifugiert und wieder bei 37°C für genau 15 Minuten (!!!) inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 30 µL LiCl-Lösung (7,5 M LiCl, 75 mM EDTA) und 30 µL sterilem H₂O wurde die Reaktion gestoppt und die RNA über Nacht bei -80°C gefällt. Am folgenden Tag wurde der Ansatz zentrifugiert

(30 Minuten, 4°C, 13000 rpm) der Überstand verworfen und die sedimentierte RNA mit reinem 70%igem Ethanol gewaschen und danach in 10 µL RNase freiem H₂O resuspendiert.

Zur Konzentrationsbestimmung und zur Überprüfung der gewonnenen RNA im Agarosegel wurde 1 µL der resuspendierten RNA mit 9 µL sterilem H₂O vermischt (1:10 Verdünnung), wovon 3 µL auf ein RNA Agarosegel aufgetragen wurden. Die verbliebenen 7 µL der RNA-Lösung wurden wiederum mit 63 µL H₂O gemischt (1:100 Verdünnung) und zur Konzentrationsbestimmung verwendet (Abschnitt 2.2.1.4.). Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.1.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Nukleinsäuren absorbieren ultraviolette Strahlung proportional zu ihrem Gehalt. Deshalb lässt sich die Konzentration von DNA- bzw. RNA-Proben photometrisch ermitteln. Hierzu wurden die jeweiligen Proben 1:100 (bei geringer DNA- bzw. RNA-Konzentration 1:50) in einem Endvolumen von 100 µL verdünnt und ihre Extinktionen bei einer für Nukleinsäuren optimalen Wellenlänge von $\lambda = 260$ gemessen (A_{260}). Bei dieser Wellenlänge ist die Absorption von Nukleinsäuren maximal. Bei Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm und bei einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/mL (bzw. bei 40 µg/mL RNA) ist die optische Dichte (OD) gleich 1. Dadurch ergibt sich folgende Gleichung zur Berechnung der Konzentration einer Probe:

$$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ µg DNA/mL bzw. } 40 \text{ µg RNA/mL} = \text{Menge (µg/mL)}$$

D. h. man multipliziert den Extinktionswert bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm (A_{260}) mit 5 (für DNA) bzw. mit 4 (für RNA) und erhält die Menge in µg/µL.

Aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ergibt sich die Reinheit einer DNA- bzw. RNA-Probe. Der Quotient OD_{260} / OD_{280} sollte hierbei zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.5. Polymeraseketteneaktion (PCR)

Zur *in vitro* Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen werden zu den Ausgangs-DNA-Strängen ("template") komplementäre Oligonukleotide (kurze DNA Fragmente) entworfen, welche das zu amplifizierende DNA-Stück flankieren. Die hierzu verwendeten Oligonukleotide (Abschnitt 7.2.) wurden allesamt so entworfen, dass das damit amplifizierte DNA-Fragment eine Xho I und eine Avr II Schnittstelle in 5'- nach 3'-Richtung

erhielt. Das Erhaltene DNA-Fragment wurde im Anschluss mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und dadurch für eine Ligation vorbereitet.

Die PCR-Reaktionen wurden mit PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) durchgeführt. Folgender Ansatz gewählt:

- Plasmid-DNA (0,2 µg/µL)	1 µL
- 5x Phusion HF Puffer	10 µL
- dNTP's (10 mM)	1 µL
- Oligonukleotid forward (2,5 µM)	5 µL
- Oligonukleotid reverse (2,5 µM)	5 µL
- Phusion-Polymerase (2U/µL)	1 µL
- ddH ₂ O	27 µL

Die Einstellungen für die PCR setzen sich aus mehreren Schritten zusammen. Im ersten Schritt wurde die DNA für 5 Minuten bei 95°C in Einzelstränge denaturiert. Darauf folgten 30 Zyklen aus Denaturierung (30 Sekunden bei 95°C), Anlagerung der Oligonukleotide (30 Sekunden bei 55°C) und Neusynthese der DNA-Stränge (1 Minute und 30 Sekunden bei 72°C). Die Reaktion wurde bei 72°C für 10 Minuten abgeschlossen und in einem analytischen Agarosegel geprüft.

2.2.1.6. Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (auch Restriktionsenzyme genannt) erkennen spezifische Sequenzen doppelsträngiger DNA und spalten hydrolytisch die entsprechenden Phosphordiesterbindungen. Die daraus resultierenden Schnittstellen können glatt ("blunt") oder überhängend ("sticky") sein. Auf diese Weise kann z. B. zirkuläre DNA linearisiert oder bestimmte Fragmente aus ihr herausgeschnitten werden. Die Einheit für die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Hierbei entspricht ein Unit der Enzymmenge, welche notwendig ist, um 1 µg λ-Phagen-DNA bei 37°C in einer Stunde zu verdauen. Entsprechend wurde je µg zu verdauender DNA ein Unit des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Der Verdau wurde für analytische Zwecke 2 – 4 Stunden und für präparative Vorbereitungen von weiterzuverarbeitenden DNA-Fragmenten über Nacht bei 37°C inkubiert. Der verwendete 10x Puffer wurde im Verhältnis zum Gesamtvolumen des Ansatzes 1:10 und die 10x BSA Lösung im Verhältnis 1:20 hinzupipettiert. Analytische Ansätze wurden in einem Volumen von 10 µL oder 20 µL, präparative in 100 µL bzw. 200 µL durchgeführt. Wurde mit zwei Enzymen gleichzeitig verdaut, musste darauf geachtet werden, dass ein geeigneter Puffer verwendet wurde, bei welchem die Aktivität beider Enzyme möglichst hoch war.

Der Volumenanteil der Enzyme darf nicht höher als 10 % sein, da diese bei zu hoher Konzentration und zu langer Inkubationszeit ansonsten unspezifisch schneiden könnten. Dies liegt am Glycerin, welches den Enzymen für die Langzeitlagerung beigemischt wird. Die Reaktionsbedingungen entsprechen den Angaben des Enzymherstellers (New England BioLabs).

Die Ansätze wurden nach der Inkubation stets in einem Agarosegel überprüft (Abschnitt 2.2.1.1.) oder zur Weiterverarbeitung aufgereinigt (Abschnitt 2.2.1.2.).

2.2.1.7. Ligation

Die für die Ligationsansätze verwendete T4 DNA (Invitrogen) Ligase katalysiert Phosphodiesterbindungen von nebeneinander liegenden 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA. Dadurch können linearisierte Plasmide und DNA-Fragmente wie beispielsweise PCR Produkte verbunden werden. Eine Einheit des Enzyms (1 U) ist definiert als die Menge, die benötigt wird, um die Konversion von 1 nmol $^{32}\text{P}_i$ in ATP in 20 Minuten bei 37°C zu katalysieren.

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Ligationen wurde ausschließlich der Vektor pSP64T verwendet. In diesen wurde die jeweils gewünschte *pfcr*-Sequenz kloniert. Hierfür wurde der Vektor zunächst mit geeigneten Enzymen (Xho I und Avr II) linearisiert und Mittels Gelextraktion aufgereinigt. Durch den Verdau mit zwei verschiedenen Enzymen kann das einzufügende DNA-Fragment nur in der richtigen Orientierung eingefügt werden.

Zur Ligation des gewünschten DNA-Fragments mit dem Vektor wurde ein Ansatz mit einem 3:1 Verhältnis von DNA-Fragment zu Vektor optimiert (Verhältnis bezieht sich auf Molekülmenge). Hierfür wurde die jeweilige DNA-Konzentration ermittelt (Abschnitt 2.2.1.4.) und das entsprechende Verhältnis errechnet.

Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes setzt sich zusammen aus 1 µL T4 DNA Ligase, 4 µL 5x Ligase Puffer, die für ein 3:1-Verhältnis entsprechenden Volumina der Fragment- und Vektor-DNA und sterilem H₂O, womit auf 20 µL aufgefüllt wurde. Nach 90 Minuten Inkubation bei RT wurde der gesamte Ansatz für die Transformation verwendet (Abschnitt 2.2.2.2.).

2.2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1. Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Unter sterilen Bedingungen wurden 250 mL SOB Medium in einem 2L Kolben mit 10 - 12, einer Ursprungskolonie entstammenden Kolonien angeimpft. Diese ließ man im Schüttler bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ heranwachsen. Nach 2 Stunden sollte in regelmäßigen, mit fortschreitender Zeit kürzer werdenden Intervallen die OD_{600} überprüft werden, die einen Wert von 0,6 nicht überschreiten darf. Als der gewünschte Wert erreicht war, wurde der Kolben aus dem Schüttler genommen und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Von diesem Zeitpunkt an müssen die Zellen immer auf Eis gehalten werden. Die Flüssigkultur wurden zum Austarieren auf zwei Zentrifugationsgefäße verteilt und 30 Minuten bei 4°C, mit einer Geschwindigkeit von 6000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde anschließend in 80 mL eiskaltem TB Puffer resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut bei 4°C, mit 6000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Sediment nach Verwerfen des Überstandes vorsichtig in 20 mL eiskaltem TB Puffer resuspendiert. Unter leichtem Schütteln wurden 1,4 mL DMSO zugefügt (7 %). Die Suspension wurde 10 Minuten auf Eis inkubieren und anschließend in Trockeneis gekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt (100 μ L/Gefäß) und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2. Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Durch die Transformation wird fremdes, genetisches Material in Form von Plasmiden in Bakterien eingebracht. Die Plasmide besitzen Resistenzgene zur anschließenden Selektion der plasmidtragenden Bakterienzellen. Zellen, die die Fähigkeit besitzen, fremde DNA aufzunehmen, werden als kompetent bezeichnet. Zur Transformation wurden ausschließlich chemokompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen verwendet.

Die benötigten Zellen (50 μ L/Transformation) wurden auf Eis aufgetaut. Wenn das in die Zellen einzubringende Plasmid einer isolierten Plasmid-DNA (Abschnitt 2.2.1.2.) entstammte, wurden je nach Konzentration der DNA 1 – 5 μ L verwendet. Entstammte das Plasmid einer Ligation, wurde der gesamte Ansatz verwendet (Abschnitt 2.2.1.7.). Die DNA Lösung wurde zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Die mit der DNA vermischten Zellen wurden nun 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mittels Hitzeschock (45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad) transformiert. Nach der darauf folgenden Erholungsphase von 2 Minuten auf Eis wurde 1 mL SOC Medium hinzugegeben und wieder durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Der transformierte Zellansatz wurde in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und im Schüttler bei 37°C für 1 – 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit

Selektions-Antibiotikum (hier mit Ampicillin) ausgestrichen (Abschnitt 2.2.2.3.) und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.3. Plattenkulturen von *E. coli*-Bakterien

In Lösung befindliche transformierte Bakterienzellen wurden mithilfe eines sterilen Glasspatels auf LB-Agarplatten mit geeignetem Selektions-Antibiotikum (hier ausschließlich Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zum einen wurde dies mit einem Ligationsansatz transformierten Zellen durchgeführt, um die am Folgetag entstandenen Kolonien für die Vervielfältigung und Aufreinigung von Plasmid-DNA zu verwenden (Abschnitt 2.2.1.2.). Zum anderen ermöglichte dies die mittelfristige Lagerung bei 4°C.

2.2.2.4. Flüssigkulturen von *E. coli*-Bakterien

Für eine Mini-Präparation wurden 5 mL LB-Medium, für eine Maxi-Präparation 400 mL LB-Medium mit einer auf einer Agarplatten gewachsenen Zellkolonie inokuliert und üN bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Die Nährmedien enthielten als Selektions-Antibiotikum jeweils 100 µg/µL Ampicillin.

2.2.2.5. Überprüfung der Transformationen

Restriktionsverdau Analyse

Um zu überprüfen, ob die Transformation erfolgreich war, wurden 5 – 10 Kolonien mit einer Pipettenspitze von den Agarplatte gepickt und durch Mini-Präparationen die Plasmid-DNA isoliert (Abschnitt 2.2.1.2.). Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend mit den zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen geschnitten und im Agarosegel überprüft, ob das gewünschte DNA-Fragment aus dem Vektor geschnitten worden war.

PCR-Analyse der Bakterienkulturen („screening“)

Eine weitere Möglichkeit, den Transformationserfolg zu überprüfen, ist der so genannte „Kolonien-Screen“. Hierbei wird eine PCR mit einer gepickten Kolonien angesetzt, wobei die in den Bakterienzellen befindliche Plasmid-DNA als Ausgangs-DNA-Strang dient. Die Durchführung variiert im Vergleich zur üblichen PCR (Abschnitt 2.2.1.5.) insofern, als dass die DNA für 9 Minuten bei 98°C anstatt für 5 Minuten bei 95°C denaturiert wurde.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Gesamt-Protein Aufreinigung aus *X. laevis* Oozyten

Zur Aufreinigung von Gesamt-Proteinen wurden zunächst die das jeweilige PfCRT exprimierende Oozyten in Oozyten Lyse Puffer, dem zuvor Protease Inhibitoren beigemischt worden waren (1 Tablette/10 mL Lyse Puffer), durch Auf- und Abpipettieren lysiert. Es wurden 10 Oozyten pro 100 μ L Lyse Puffer verwendet. Das Oozytenlysat wurde anschließend bei 4°C 30 Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein sauberes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert (4°C, 30 Minuten, maximale Geschwindigkeit) und wieder in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Die aufgereinigten Gesamt-Proteine wurden bei -20°C gelagert.

2.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ermöglicht es, Proteine unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichts aufzutrennen. Die dabei verwendete Matrix besteht aus polymerisiertem Acrylamid und N,N'-Methylbisacrylamid. Die Porengröße und die damit einhergehenden Trennungseigenschaften des Gels hängen vom Anteil des Acrylamids und dessen Vernetzungsgrades ab. Der Acrylamid-Anteil des Gels wird entsprechend der Größe des aufzutrennenden Proteins gewählt (je kleiner das Protein, desto höher der Acrylamid-Anteil). In der vorliegenden Arbeit wurden aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestehende Gele mit einem Acrylamid Anteil von 12 % verwendet (Tabelle 2.1.).

Tabelle 2.1.: Pipettieransatz für das Herstellen von SDS-Polyacrylamid-Gelen

	Trenngel	Sammelgel
	[μ L]	
H ₂ O	3400	3400
Acrylamid/bis (29:1)	4000	830
Tris (1,5 M; pH 8,8)	2500	—
Tris (1,0 M; pH 6,8)	—	630
SDS (10%)	100	50
APS (10%)	100	50
Temed	5	6

Die zu analysierenden Proteine werden durch β -Mercapthoethanol reduziert und erhalten durch das SDS eine gleichmäßig negative Ladung, welche eine Auftrennung entsprechend ihrer molaren Masse im Trenngel ermöglicht.

Bevor das Gel mit Proteinproben beladen werden konnte, wurden diese für drei Minuten bei 70°C im Ladepuffer denaturiert. Das Auftrennen der Proteine erfolgte in Laufpuffer bei 60 mA konstant für 60 – 70 Minuten (bis zum Auslaufen der Bromphenol-Blau-Front). Die Gele wurde im Anschluß, je nach Bedarf, entweder in Coomassie Färbelösung ge- und anschließend in Entfärbelösung entfärbt oder für den Western Blot vorbereitet.

2.2.3.3. Coomassie Anfärbung von Proteinen

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, um sicherzustellen, dass gleiche Proteinmengen aufgeladen worden waren. Das Gel wurde hierzu zunächst mit ddH₂O gewaschen und anschließend in der Coomassie Färbelösung bei RT für 20 Minuten angefärbt. Zur Entfärbung wurde das Gel in Entfärbelösung inkubiert, bis die einzelnen Banden sichtbar waren.

2.2.3.4. Western Blot

Proteine können mittels Western Blot detektiert werden, indem sie nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.3.2.) vom Gel auf eine geeignete Membran transferiert werden. Diese Membran wird anschließend mit spezifischen Antikörpern behandelt, um so das gewünschte Protein bzw. Polypeptid zu detektieren. Hier wurden ausschließlich Membranen aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) verwendet.

Der Transfer von Proteinen vom SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF Membran wurde durch eine "Semi-dry" Transfer bewerkstelligt. Eine PVDF Membran wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und zur Aktivierung für 30 Sekunden in Methanol getaucht. Das Gel wurde nach der Elektrophorese 3 – 4 mal mit ddH₂O gewaschen. Membran und Gel wurden anschließend in Semi-dry Transfer-Puffer für 20 Minuten bei RT inkubiert. Außerdem wurden sechs Stück Whatman Filterpapiere ebenfalls auf Gelgröße zurechtgeschnitten und mit Transfer-Puffer durchtränkt. Drei Stück Whatman Filterpapiere wurden auf die Elektrode der Transfer-Kammer geschichtet, worauf die Membran gelegt und mit Puffer bedeckt wurde. Darauf wiederum wurde das Gel gelegt und mit drei weiteren Stück Whatman Filterpapiere bedeckt (Abbildung 2.3.). Bei der gesamten Prozedur ist es wichtig, keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten entstehen zu lassen, damit der Proteintransfer reibungslos ablaufen kann.

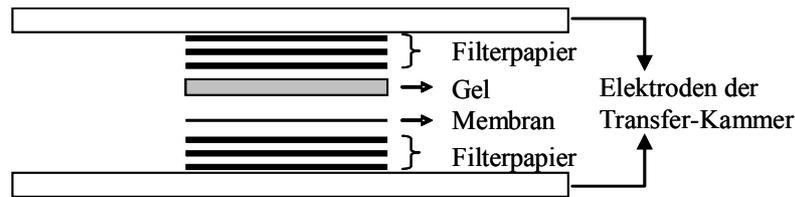


Abbildung 2.3.: Schematischer Aufbau für den Proteintransfer

Der Proteintransfer wurde bei 15 V, 230 mA konstanter Stromstärke für 60 Minuten durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierlösung und anschließend 60 Minuten mit dem Erst-Antikörper (anti-PfCRT, 1:1000 bzw. anti-Tubulin, 1:2000 in 1 % BSA in PBS verdünnt) inkubiert. Die Membran wurde anschließend drei mal 10 Minuten mit PBST gewaschen und 30 - 45 Minuten erneut in Blockierlösung inkubiert. Danach wurde mit dem Zweit-Antikörper (anti-Meerschweinchen-POD (für anti-PfCRT) bzw. anti-Kaninchen-POD (für anti-Tubulin) 1:10000 in 1 % BSA in PBS verdünnt) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Zum Schluß wurde drei mal 10 Minuten mit PBST und ein mal 10 Minuten mit PBS gewaschen und die Proteine mittels Chemilumineszenz (Enhanced Chemilumineszenz Kit) und Film detektiert.

2.2.3.5. Abwaschen von Antikörpern auf Polyvinylidendifluorid Membranen

Um ein anderes Protein auf einer für den Nachweis von Proteinen schon verwendeten Polyvinylidendifluorid Membranen zu detektieren, muss diese zuvor vom Antikörper, mit welchem sie bereits behandelt worden ist, befreit werden. Zum Abwaschen dieses Antikörpers wurde die Membran zunächst 5 mal 10 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend bei 50 – 55°C 30 Minuten in Stripping Puffer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wie zuvor wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierlösung inkubiert. Für den Nachweis eines anderen Proteins wurde anschließend wie im vorigen Abschnitt mit dem entsprechenden Antikörper verfahren.

2.2.4. Umgang mit *Xenopus laevis* Oozyten

2.2.4.1. Umgang mit den Fröschen und Gewinnung und Behandlung der Oozyten

Zunächst wurde der Frosch in einer 0,1 %igen 3-Aminobenzoe-säureethylester in eiskaltem Wasser für 20 Minuten anästhesiert. Durch die niedrige Temperatur der Lösung wird die betäubende Wirkung des Anästhetikums unterstützt, wodurch die Sensorik des Frosches zusätzlich herabgesetzt wurde. Der anästhesierte Frosch wurde anschließend mit dem Rücken auf eine eiskalte Unterlage gelegt und dessen Haut und die Bauchwand mit einem 1 cm

langen Schnitt an der Seite des Abdomens geöffnet. Mit zwei sterilen Pinzetten wurden dann Teile der Ovarien aus dem Bauchraum entnommen und in Ca^{2+} -freien Puffer (OR2) überführt. Nachdem die notwendige Menge an Oozyten entnommen worden war, wurden die Schnitte der Bauchwand und der Haut unabhängig voneinander mit resorbierbarem, sterilem chirurgischem Nahtmaterial zugenäht. Der noch anästhetisierte Frosch wurde danach in ein kleines Wasserbecken gesetzt und beobachtet, bis er nach dem Nachlassen der Narkosewirkung eigenständig an der Wasseroberfläche Luft holen konnte.

Nachdem der Frosch wieder vollständig aus der Narkose erwacht war, wurde er in ein großes Wasserbecken zusammen mit mindestens zwei weiteren Exemplaren überführt, da es für das Befinden des Frosches nachteilig wäre, alleine in einem Becken zu verweilen. Darunter würde auch die Qualität der Oozyten leiden, was zu Problemen in den Versuchen führen würde. Eine konstant gleichbleibende Qualität der Oozyten ist für verlässliche Versuchsergebnisse eine wichtige Voraussetzung.

Damit der Frosch sich vollständig von der Operation erholen kann, sollten zwischen zwei Operationen am selben Frosch mindestens 8 Wochen vergehen. Eine zu kurze Regenerationszeit dazwischen hätte ebenfalls negative Auswirkungen auf das Befinden des Frosches und der Qualität der Oozyten zur Folge.

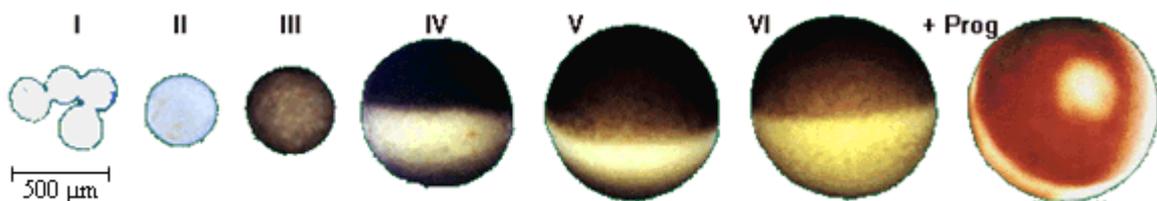


Abbildung 2.4.: Einteilung der Reifestadien von *X. laevis* Oozyten nach Dumont

Stadium I: Oozyten sind durchsichtig (50 - 300 μm), Stadium II: Oozyten sind mattweiß (300 - 450 μm), Stadium III: Oozyten sind überall leicht pigmentiert (450 - 600 μm), Stadium IV: Oozyten beginnen Dotterproteine im Zytoplasma anzureichern; Pigmentierung konzentriert sich auf den oberen, animalen Pol (600 - 1000 μm), Stadium V: Oozyten reichern weiterhin Dotterproteine an; Pigmentierung nimmt zu (1000 - 1100 μm), und Stadium VI: Oozyten sind ausgewachsen und haben Progesteron Rezeptoren auf der Plasmamembran (1100 - 1300 μm). In diesem Stadium findet - unter Einfluß von Progesteron - Meiose statt, es entsteht eine weiße Verfärbung auf dem animalen Pol. Für die cRNA-Injektion wurden Oozyten des Stadiums V oder VI ausgewählt. (Quelle: Smith *et al.*, 1991)

Die Ovarienstücke wurden mit einer Schere grob zerkleinert und bis zu 10 mL davon in ein 50 mL Schraubdeckel-Röhrchen überführt. Nach zehn- bis fünfzehnmaligem Waschen mit Ca^{2+} -freiem Puffer (OR2) wurden die Oozyten über Nacht unter leichtem Schütteln bei 18°C mit Kollagenase behandelt, um Follikelzellen zu entfernen und die Oozyten zu vereinzeln. Da

Kalcium Proteasen aktiviert, würde eine Behandlung mit Kollagenase in Anwesenheit von Kalcium die Oozyten zerstören (Goldin, 1992). Deshalb wurde die Kollagenaselösung (1 mg/mL) in Ca^{2+} -freiem Puffer hergestellt. Am folgenden Tag wurden die Oozyten 10 mal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen und anschließend in Ca^{2+} -haltigem ND96-Puffer (pH 7,5) überführt. Unter einem Binokular wurden Oozyten des Reifestadiums V oder VI (Abbildung 2.4.) (Dumont, 1972) ausgesucht, in eine Petrischale mit ND96-Puffer (pH 7,5) überführt und nach einer Ruhephase von mindesten zwei Stunden bei 18°C mit der gewünschten cRNA injiziert.

2.2.4.2. Injektion von cRNA in die Oozyten

Die gewünschte cRNA wurde mit Hilfe eines hydraulischen Injektors, eines Binokulares und eines Mikromanipulators mittels einer Injektionsnadel in die Oozyten injiziert. Die Injektionsnadeln wurden aus Glaskapillaren mit einer Kapillarziehmaschine hergestellt, wobei die Spitze der Kapillare abgebrochen wurde, so dass der Durchmesser der Öffnung an der Spitze 20 μM – 30 μM betrug.

Die cRNA-Lösung wurde in die Injektionsnadel aufgesaugt, nachdem diese am Kapillarenhalter des hydraulischen Injektors befestigt worden war. Es wurden 30 ng cRNA pro 46 nL H_2O in jede Oozyte injiziert. Hierzu wurden die Oozyten in einer dafür konstruierten Plexiglasschale mit mehreren 3 mm - 5 mm breiten Schienen angeordnet und mit ND96-Puffer, pH 7,5 überdeckt. Die cRNA wurde in den vegetativen Pol injiziert, da in der animalen Hälfte der Oozyte der Zellkern lokalisiert ist. Dadurch wurde vermieden, cRNA in den Zellkern zu injizieren oder diesen zu beschädigen und dadurch die Zelle abzutöten. Zur Negativkontrolle wurden Oozyten mit Wasser injiziert und innerhalb eines Versuches parallel zu den mit cRNA injizierten verwendet.

2.2.4.3. Inkubation der Oozyten

Nach der Injektion der cRNA wurden die Oozyten 48 h - 72 h in einer Petrischale mit ND96-Puffer, pH 7,5 bei 18°C inkubiert. Das ND96-Inkubationsmedium wurde einmal täglich gewechselt, schadhafte Oozyten wurden aussortiert. Diese geben nämlich Salze und Proteasen ab, wodurch die Inkubationslösung toxisch für die verbleibenden, noch intakten Oozyten wird (Goldin, 1992). Nach der Expressionszeit wurden die Oozyten nochmals geprüft und gegebenenfalls beschädigte aussortiert. Anschließend wurden sie für Transportstudien verwendet.

2.2.4.4. Transportstudien mit Oozyten und Messung der Radioaktivität

Die Oozyten wurden mit ND96-Puffer, pH 7,5 gewaschen. Anschließend wurden je Ansatz 10 Oozyten in einem 2 mL Reaktionsgefäß mit 100 µL ND96-Puffer, pH 6,0 mit einer definierten Konzentration von [³H]-CQ bzw. [³H]-QN oder [³H]-QD und den entsprechenden nicht radioaktiv markierten Substraten (siehe hierzu Abschnitt 3.1.) für 60 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Oozyten drei mal auf Eis mit reinem ND96-Puffer, pH 6,0 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Oozyten einzeln in Szintillationsröhrchen überführt (1 Oozyte je Szintillationsröhrchen) und durch Zugabe von 200 µL 5 %igem SDS lysiert. Um die von den Oozyten aufgenommene Menge an [³H]-CQ, [³H]-QN und [³H]-QD zu messen, wurden zum Schluss je Röhrchen 2 mL Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben. (Abschnitt 2.2.4.5.).

Szintillatoren werden durch β-Strahlen angeregt. Diese Anregungsenergie geben sie anschließend in Form von Licht (meist im UV- oder sichtbaren Bereich) wieder ab. Wenn im flüssigen Szintillator ein β-Teilchen emittiert wird, werden entlang seiner Bahn die Moleküle des Lösungsmittels angeregt, welche ihre Energie auf einen primären Szintillator übertragen. Dieser nimmt diese Energie auf und fluoresziert bei einer höheren Wellenlänge. Diese Lichtquanten treffen auf einen sekundären Szintillator, welcher wiederum angeregt wird und Licht emittiert, dessen Wellenlänge eine gute Zählausbeute ermöglicht (Wilson & Goulding, 1991). Zur Bestimmung der in den Oozyten akkumulierten Menge an [³H]-CQ, [³H]-QN bzw. [³H]-QD wurden je 2 mL Szintillationsflüssigkeit zu den mit 200 µL SDS lysierten Oozyten in Szintillationsröhrchen gegeben. Die Proben wurden anschließend in den β-Strahlen-Zähler gestellt, in welchem die Radioaktivität in Zählungen pro Minute (counts per minute, cpm) gemessen wurde. Daraus ließ sich die in den Oozyten aufgenommene Menge an CQ, QN oder QD (pmol/Oozyte/h) nach der folgenden Formel berechnen.

$$\text{aufgenommenes CQ, QN bzw, QD (pmol/Oozyte/h)} = \text{cpm} \times \frac{\text{Konz. des CQ, QN bzw, QD im Aufnahmepuffer } (\mu\text{M})}{\text{gemessene cpm des Aufnahmepuffers pro } \mu\text{L}}$$

2.2.5. Auswertung, Berechnungen und statistische Analysen

Alle für die vorliegende Arbeit notwendigen Kalkulationen (Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler, statistische Analysen und student's t-Test-Analysen) wurden am Computer mit Hilfe der Programme Microsoft® Excel 2003 (Microsoft Corporation.) und SigmaPlot 2008 für Windows, Version 11 und 12 (Systat Software, Inc.) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Messung des Transports von CQ, QN und QD mit Oozyten von *X. laevis* zur Validierung des Expressionssystems

In vorangegangenen Studien von R. E. Martin und Kollegen konnten PfCRT exprimierende *X. laevis* Oozyten als stabiles Expressionssystem zur Messung von CQ Transport bestätigt werden (Martin *et al.*, 2009b). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PfCRT als vakuoläres Transmembranprotein diverse putative Signalsequenzen in seinem N- und C-Terminus besitzt, wodurch PfCRT im Parasiten zur Membran der Nahrungsvakuole dirigiert wird. In Oozyten hingegen wird das Protein an anderer Stelle als der Plasmamembran exprimiert. Gezieltes ausschalten dieser putativen Signalsequenzen durch Mutation bestimmter Aminosäuren zu Alanin (A) bewirkt eine stabile Expression an der Plasmamembran der Oozyte. Dadurch werden effiziente Transportstudien ermöglicht (Martin *et al.*, 2009b). We. Abbildung 3.1. veranschaulicht die Unterschiede zwischen dem nativen (PfCRT) und dem mutierten (PfCRT*) Protein.

	N-Terminus										C-Terminus																																																								
	10		20		30		40		50		410		420																																																						
PfCRT																																																					
PfCRT*	M	K	F	A	S	K	K	N	N	Q	K	N	S	K	N	A	E	R	A	R	A	A	D	N	A	Q	E	G	N	S	R	L	G	G	S	C	L	G	K	C	A	H	A	A	K	A	A	---	E	E	N	A	D	S	A	G	A	L	T	N	V	D	S	A	A	T	Q

Abbildung 3.1.: Vergleich der N- und C-Termini von nativem und mutiertem PfCRT

Das native PfCRT (PfCRT) besitzt in seinem N- und C-Terminus diverse putative Signalsequenzen, welche das Protein im Parasiten zur Membran der Nahrungsvakuole dirigiert. Im mutierten PfCRT (PfCRT*) sind diese Signalsequenzen gezielt zu Alaninen mutiert worden, um eine stabile Expression an der Plasmamembran der Oozyte zu erreichen.

Die Membran der Nahrungsvakuole des Parasiten – der Wirkungsort von PfCRT – trennt das intravakuoläre Medium (pH ~5,4) vom parasitären Zytosol (pH ~7,4). Im Aufnahmeversuch trennt die Membran der Oozyte den intraoozytären Bereich (pH ~7,5) vom Aufnahmepuffer (pH 6,0) im Reaktionsgefäß. Das Innere der Oozyte mit neutralem pH-Wert simuliert also das Zytosol des Parasiten, der Aufnahmepuffer mit saurem pH-Wert dessen Nahrungsvakuole. Somit ist das in der Oozyte aufgenommene Substrat wie beispielsweise CQ prinzipiell vergleichbar mit dem CQ, das der Parasit aus der Nahrungsvakuole herausschleust.

Die von der Firma GeneART AG synthetisierten Codon-optimierten codierenden Sequenzen von PfCRT^{Dd2} (CQR) und PfCRT^{HB3} (CQS), wurden jeweils in den pSP64T Vektor kloniert (Abschnitt 2.1.9.). Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Aminosäuresequenzen der beiden PfCRT-Varianten sind in Tabelle 3.1. dargestellt. Acht Mutationen bewirken die grundlegenden Unterschiede zwischen den beiden Varianten des Transporters.

Tabelle 3.1.: Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen von PfCRT^{Dd2} und PfCRT^{HB3}

Die grau unterlegten Aminosäuren zeigen die Polymorphismen in PfCRT^{Dd2}. Es sind im gesamten Protein acht Aminosäuren mutiert (CQS = Chloroquin sensitiv, CQR = Chloroquin resistent)

PfCRT Variante	Herkunft	Aminosäureposition in PfCRT							
		74	75	76	220	271	326	356	371
HB3	Indochina	M	N	K	A	Q	N	I	R
Dd2	Honduras	I	E	T	S	E	S	T	I

Die *in vitro* synthetisierte cRNA der beiden PfCRT Varianten wurde in Oozyten injiziert, welche nach einer Expressionszeit von 72 Stunden in ND96-Puffer (pH 7,5) bei 18°C für Transportstudien mit CQ, QN und QD verwendet wurden. Die injizierten Oozyten wurden vor dem Aufnahmeversuch einmal mit ND96-Puffer, pH 7,5 gewaschen und danach für 1 Stunde bei 25°C in 100 µL Aufnahmepuffer (ND96-Puffer, pH 6,0, mit 10 µM CQ, QN bzw. QD und zusätzlich jeweils 50 nM [³H]-CQ, [³H]-QN bzw. [³H]-QD) inkubiert. Auf dieselbe Art und Weise wurde mit Wasser injizierten Oozyten verfahren, welche als Kontrolle dienten. Nach der einstündigen Inkubationszeit im jeweiligen Aufnahmepuffer wurden die Oozyten mit ND96 Puffer, pH 6,0 gewaschen und danach einzeln in Szintillationsröhrchen überführt. Anschließend wurden die Oozyten in SDS (5 %ig) lysiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde im β-Strahlen-Zähler in Zählungen pro Minute (counts per minute, cpm) gemessen und nachfolgend in die Einheit pmol/Oozyte/h umgerechnet (siehe Formel in Abschnitt 2.2.4.5.). Zur Normalisierung der jeweiligen Werte wurden diese in prozentualer Relation zu PfCRT^{Dd2} dargestellt.

Die durch PfCRT^{Dd2} vermittelte Akkumulation an CQ war, wie erwartet, signifikant höher (p < 0,001, student's t-Test) als die durch Kontrolloozyten akkumulierte Menge. Zwischen PfCRT^{HB3} und Kontrolloozyten gab es, ebenso erwartungsgemäß, keine signifikanten Unterschiede. Genauso verhielt es sich für die Aufnahme von QN und QD (Abbildung 3.2. A). Die Akkumulation durch PfCRT^{Dd2} war mit p < 0,001 (***) signifikant höher als die durch Kontrolloozyten, zwischen PfCRT^{HB3} und Kontrolloozyten gab es keinerlei Unterschiede in der Aufnahme des jeweiligen Substrates. Mithilfe eines Anti-PfCRT

Antikörpers wurde im Western Blot die Expression der beiden PfCRT Varianten qualitativ nachgewiesen (Abbildung 3.2. B).

Alle in dieser Arbeit untersuchten PfCRT Varianten beziehen sich auf die Signalsequenzfreie Form, welche für die Expression in Oozyten optimiert wurde (Abbildung 3.1.).

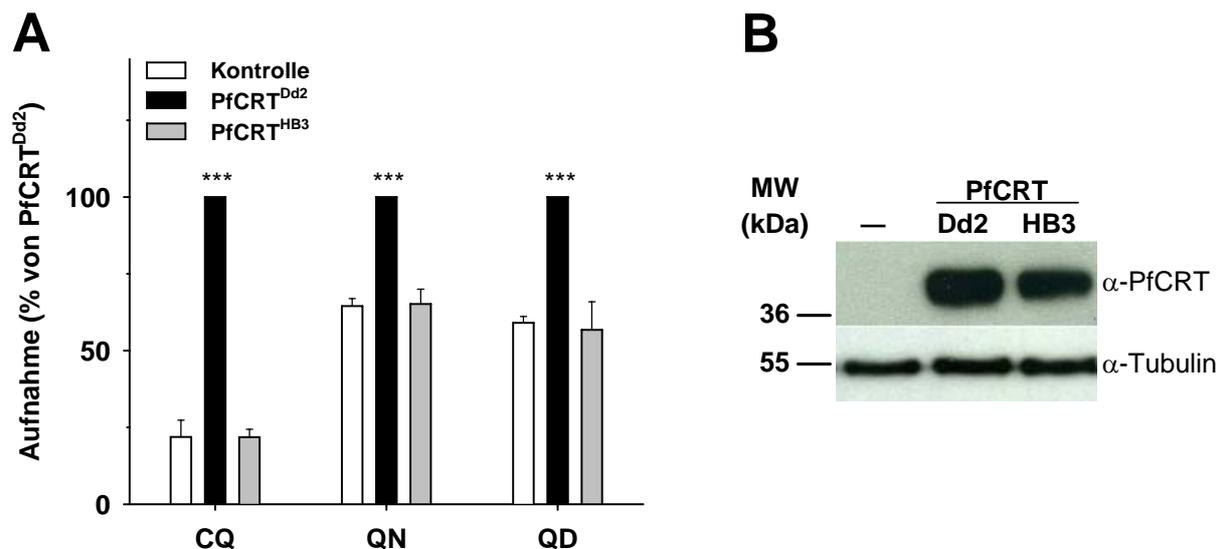


Abbildung 3.2.: Aktivität und Expression von PfCRT

Oozyten wurden mit cRNA von PfCRT^{Dd2}, PfCRT^{HB3} und mit Wasser (Negativkontrolle) injiziert. Nach einer Expressionszeit von 72 Stunden bei 18°C wurden diese für Aufnahmestudien und zum Nachweis der Expression verwendet. (A) Es wurden jeweils 10 Oozyten in einem Aufnahmepuffer (pH 6,0) mit 10 µM CQ, QN bzw. QD und 50 nM des entsprechenden radioaktiv markierten Substrates (³H]-CQ, [³H]-QN bzw. [³H]-QD) für 1 Stunde bei 25°C inkubiert. Nur in PfCRT^{Dd2} exprimierenden Oozyten war erwartungsgemäß hinsichtlich akkumulierter Substratmenge ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolloozyten zu erkennen. Zwischen PfCRT^{HB3} exprimierenden Oozyten und Kontrolloozyten gab es, auch erwartungsgemäß, keinen signifikanten Unterschied. Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Versuchen (***) = p < 0,001). (B) Zellysate wurden aus jeweils 10 Oozyten hergestellt. Davon wurden je Ansatz 10 µL für die SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendet. Anschließend wurden die Proteine aus den Lysaten für den immunochemischen Nachweis auf eine entsprechende Membran überführt und mit einem anti-PfCRT Antikörper behandelt. Als Kontrolle für das Ladevolumen wurde anti-Tubulin Antikörper verwendet.

Verapamil (VP) ist bekannterweise ein PfCRT-Blocker und sensibilisiert CQ resistente Parasiten für CQ (Henry *et al.*, 2006, Martin *et al.*, 1987). Um zu bestätigen, dass die Akkumulation der Substrate auf den PfCRT vermittelten Transport zurückzuführen ist, wurde exemplarisch die Aufnahme von CQ in Anwesenheit von VP gemessen. Hierzu wurde wie im vorangegangenen Versuch (Abbildung 3.2.) verfahren. Jeweils 10 *pfcr*^{Dd2} und H₂O injizierte Oozyten wurden in 100 µL Aufnahmepuffer (10 µM CQ und 50 nM [³H]-CQ in ND96-Puffer, pH 6,0) für 60 Minuten bei 25°C inkubiert. Gleichzeitig wurden vergleichbare

Oozyten im gleichen Puffer, allerdings mit dem Zusatz von 100 μM VP, inkubiert. Anschließend wurde die in den Oozyten aufgenommene Menge CQ gemessen (Abbildung 3.3.).

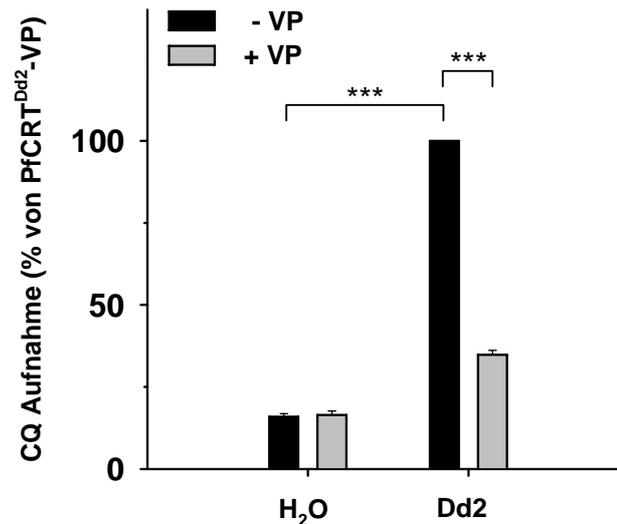


Abbildung 3.3.: Inhibierung des PfCRT vermittelten CQ Transports durch VP

CQ Aufnahme wurde mit 10 μM CQ jeweils ohne und mit 100 μM VP im Aufnahmepuffer (pH 6,0) gemessen. Zwischen Wasser injizierten Oozyten mit und ohne VP ist kein Unterschied zu erkennen. PfCRT^{Dd2} exprimierende Oozyten hingegen zeigen eine signifikant höhere Aufnahme als mit Wasser injizierte jeweils ohne VP. Ebenso signifikant höher ist die CQ Aufnahme in PfCRT^{Dd2} injizierten Oozyten ohne VP als in PfCRT^{Dd2} injizierten mit VP. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen (***) = $p < 0,001$).

Die ohnehin geringe Akkumulation von CQ in Kontrolloozyten (mit H₂O injiziert) wurde durch VP nicht beeinflusst, es ist kein signifikanter Unterschied zwischen mit und ohne VP im jeweiligen Aufnahmepuffer (pH 6,0) inkubierten Oozyten zu erkennen. Die Menge an CQ, welche in PfCRT^{Dd2} exprimierenden Oozyten akkumuliert worden war, erwies sich - wie schon in Abbildung 3.2. gezeigt worden ist - als signifikant höher im Vergleich zu Kontrolloozyten. Im Gegensatz dazu jedoch war die CQ Aufnahme in PfCRT^{Dd2} exprimierenden Oozyten, welche in Aufnahmepuffer mit VP inkubiert worden waren, mit $p < 0,001$ signifikant niedriger als in VP freiem Aufnahmepuffer inkubierten Oozyten (Abbildung 3.3.). Dies zeigt, dass die in Oozyten akkumulierte Menge an CQ durch das transmembrane Transportprotein PfCRT vermittelt wird und durch VP inhibiert werden kann.

Diese Vorversuche haben das durch R. E. Martin und Kollegen etablierte Expressionssystem (Martin *et al.*, 2009b) mit der dafür optimierten *pfCRT* DNA Sequenz als solches nochmals bestätigt und auch die eigene Handhabung als erfolgreich bekundet. Dies erlaubt nun vielseitige, vielversprechende und auch verlässliche Studien des Proteins.

3.2. Untersuchung zu den Substratbindetaschen für CQ und QN in PfCRT^{Dd2}

Nachdem die vorangegangenen Versuche bestätigt haben, dass *X. laevis* Oozyten ein funktionierendes heterologes Expressionssystem darstellen, womit der PfCRT vermittelte Transport von Chinolinen gemessen werden kann, sollten nun durch gezielte Wettbewerbsversuche Rückschlüsse auf die Substratbindetaschen für CQ und QN gezogen werden. Zu diesem Zweck wurde der gegenseitige Einfluss der beiden Substrate auf den jeweiligen PfCRT^{Dd2} vermittelten Transports untersucht.

Zunächst wurde die durch PfCRT^{Dd2} vermittelte Akkumulation von CQ in Anwesenheit von verschiedenen QN-Konzentrationen im externen Medium gemessen. Anschließend wurden die Bedingungen invertiert und unter Zugabe von verschiedenen CQ-Konzentrationen in das externe Medium die PfCRT^{Dd2} vermittelte Aufnahme von QN gemessen. Diese konzentrationsabhängigen Wettbewerbsstudien haben gezeigt, dass sich CQ und QN tatsächlich in Bezug auf den Transport durch PfCRT^{Dd2} gegenseitig beeinflussen.

3.2.1. QN inhibiert den PfCRT^{Dd2} vermittelten Transport von CQ

Durch konzentrationsabhängige Aufnahmestudien sollte zuerst untersucht werden, ob QN den PfCRT^{Dd2} vermittelten Transport von CQ beeinflusst. Dazu wurde die Akkumulation von CQ in PfCRT^{Dd2} exprimierenden und mit H₂O injizierten Oozyten gemessen. Die hierfür verwendeten Aufnahmepuffer wurden in fünf verschiedenen CQ-Konzentrationen (10 µM - 500 µM) angesetzt, wobei jede dieser CQ-Konzentrationen mit sechs verschiedene QN-Konzentrationen (0 µM – 300 µM) kombiniert wurde. Die Aufnahmestudien fanden bei einer Reaktionstemperatur von 25°C und einem pH von 6,0 statt. Die Inkubationszeit betrug stets 60 Minuten.

Die PfCRT^{Dd2} vermittelte CQ Aufnahme resultiert aus der Differenz der jeweils in PfCRT^{Dd2} exprimierenden Oozyten und Kontrolloozyten (mit H₂O injiziert) akkumulierten Menge. Diese akkumulierte Menge CQ (pmol/Oozyte/h) wurde jeweils als Funktion der im

Aufnahmepuffer enthaltenen CQ-Konzentrationen und in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentration des konkurrierenden Substrates QN als Michaelis-Menten Kurve aufgetragen (Abbildung 3.4. A). Für jede der sechs Kurven ergeben sich bei verschiedenen QN-Konzentrationen verschiedene K_m - und V_{max} -Werte, welche als Funktion der QN-Konzentration aufgetragen wurden. Der K_m (CQ) = $187,05 \pm 25,32$ steigt mit zunehmender QN-Konzentration hyperbolisch an (Abbildung 3.4. B) und strebt gegen den Grenzwert $\alpha K_S = 724,72 \pm 378,09 \mu\text{M}$, was den Faktor $\alpha = 3,87 \pm 1,95$ liefert. Der entsprechende V_{max} (CQ) = $34,36 \pm 1,88$ nimmt hyperbolisch ab und neigt sich dem Grenzwert $\beta V_{max} = 3,27 \pm 1,85 \text{ pmol/Oozyte/h}$ zu (Abbildung 3.4. C) (Segel, 1993). Daraus resultiert der Faktor $\beta = 0,10 \pm 0,05$, um welchen V_{max} (CQ) zu V_{min} (QN) reduziert wird.

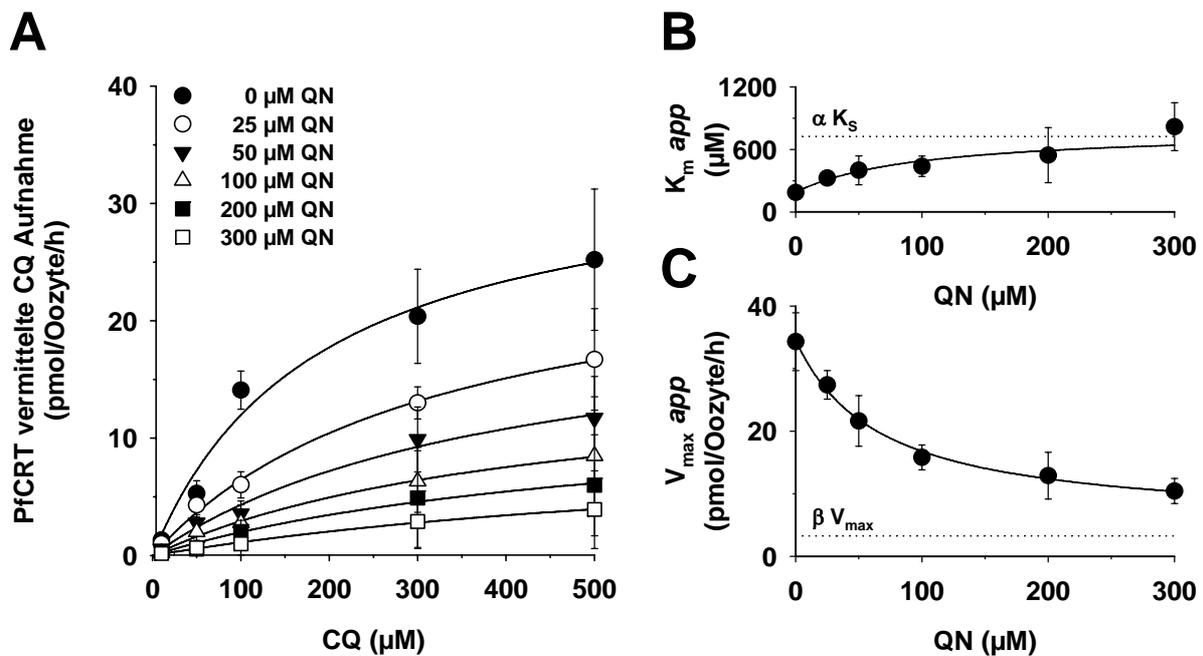


Abbildung 3.4.: Transportkinetik von PfCRT^{Dd2} für CQ in Anwesenheit von QN

(A) PfCRT^{Dd2} vermittelte CQ Aufnahme in Abhängigkeit steigender QN-Konzentration. (B) K_m -Werte nähern sich mit zunehmender QN-Konzentration hyperbolisch an den Grenzwert αK_S . (C) V_{max} -Werte hingegen sinken hyperbolisch ab und streben auch hier gegen einen Grenzwert, βV_{max} . Einzelne Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Michaelis-Menten Kurven, K_m - und V_{max} -Werte und die entsprechenden Faktoren α und β wurden mittels SigmaPlot 11.0[®] bzw. SigmaPlot 12[®] ermittelt.

Diese Analysen deuten auf eine **partiell (hyperbolisch) gemischte Inhibierung** hin, welche als eine Mischung aus kompetitiver und unkompetitiver Inhibierung angesehen werden kann (Baker *et al.*, 2007, Bisswanger, 2008). Entscheidend bei dieser Art der Inhibierung ist, dass

das Enzym bzw. in diesem Fall der Transporter, selbst bei Sättigung des konkurrierenden Substrates immer eine katalytische Restaktivität bewahrt, was dadurch zum Ausdruck kommt, dass der V_{\max} -Wert gegen einen Grenzwert > 0 strebt (Abbildung 3.4. C) (Segel, 1993).

Um diese Beobachtung zu unterstützen, wurden die Michaelis-Menten Kurven doppelt reziprok aufgetragen (Lineweaver-Burke Darstellung) (Abbildung 3.5. A). Diese Darstellung liefert Hinweise auf Transport- bzw. Inhibierungsmechanismen. Die Geraden schneiden sich im dritten Quadranten (unten links), was ein Indiz für eine partiell gemischte Inhibierung ist, wobei die Bindung der beiden Substrate an unterschiedlichen Bindetaschen zufällig und unabhängig voneinander stattfindet (Stein, 1986). Weiterhin wurde die Steigung der einzelnen Lineweaver-Burke Geraden als Funktion der QN-Konzentration aufgetragen. Im Gegensatz zum Mechanismus einer rein gemischten Inhibierung, bei welchem die Steigung der Geraden linear zunimmt, deutet die hyperbolische Zunahme (Abbildung 3.5. B) auf eine partiell gemischte Inhibierung hin (Baker *et al.*, 2007, Bisswanger, 2008)

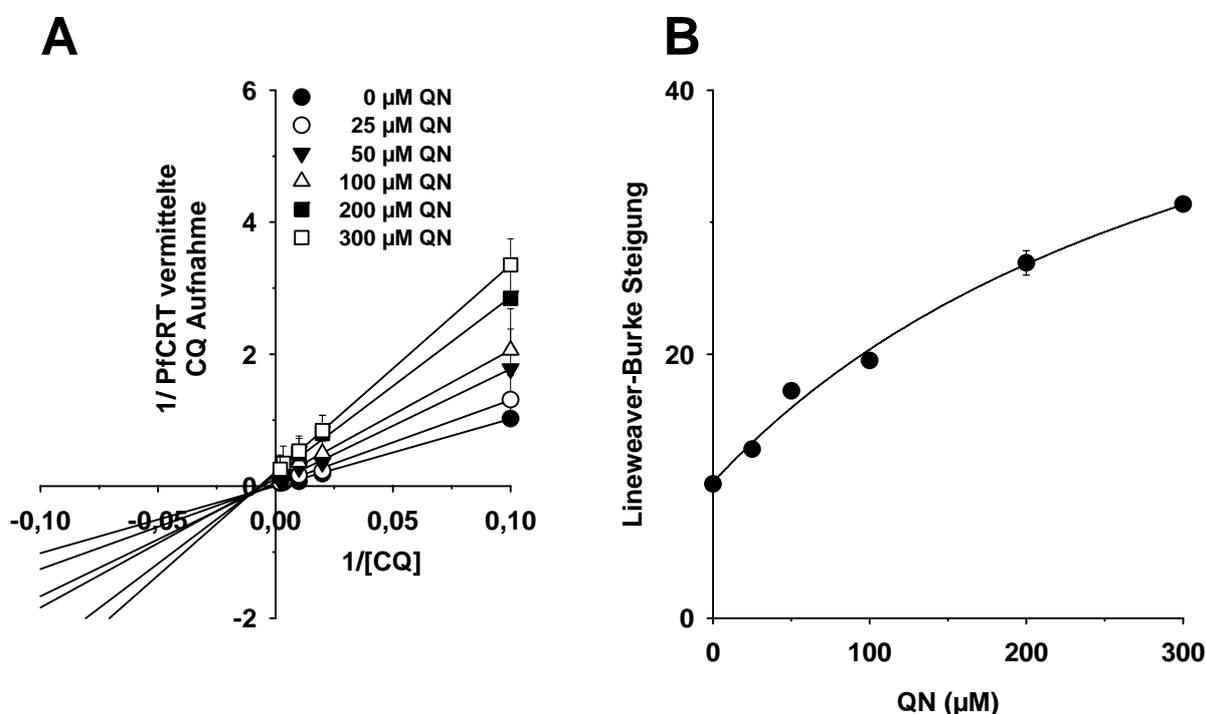


Abbildung 3.5.: Lineweaver-Burke Darstellung und Auftragung der jeweiligen Steigung als Funktion der QN-Konzentration

(A) Linearisierungsverfahren mit dem Schnittpunkt im dritten Quadranten und (B) die hyperbolische Zunahme der Steigung der Geraden deuten auf einen Mechanismus hin, bei welchem die zwei konkurrierenden Substrate zufällig und unabhängig voneinander an unterschiedlichen Bindetaschen binden.

Die analysierten Ergebnisse deuten stark auf eine partiell gemischte Inhibierung hin. Um dies zu untermauern wurde der Versuch umgekehrt, d. h. die PfCRT^{Dd2} vermittelte QN Akkumulation wurde unter Zugabe von verschiedenen CQ-Konzentrationen gemessen.

3.2.2. Ebenso inhibiert CQ den PfCRT^{Dd2} vermittelten Transport von QN

Die vorangegangenen Versuche wurden nun unter umgekehrten Bedingungen wiederholt, um die erzielten Ergebnisse zu stützen. Hierfür wurde die QN Akkumulation bei sechs verschiedenen QN-Konzentrationen (1 μM – 75 μM) im externen Aufnahmepuffer gemessen, wobei für jede dieser QN-Konzentrationen sechs verschiedene CQ-Konzentrationen (0 μM - 3000 μM) gewählt wurden. Die QN Akkumulation wurde unter denselben Reaktionsbedingungen wie im vorigen Versuch in PfCRT^{Dd2} exprimierenden und mit H₂O injizierten Oozyten gemessen. Die aus der Differenz resultierende PfCRT^{Dd2} vermittelte QN Aufnahme (pmol/Oozyte/h) in Abhängigkeit zunehmender CQ-Konzentration wurde gegen die QN-Konzentrationen als Michaelis-Menten Kurven aufgetragen (Abbildung 3.6. A).

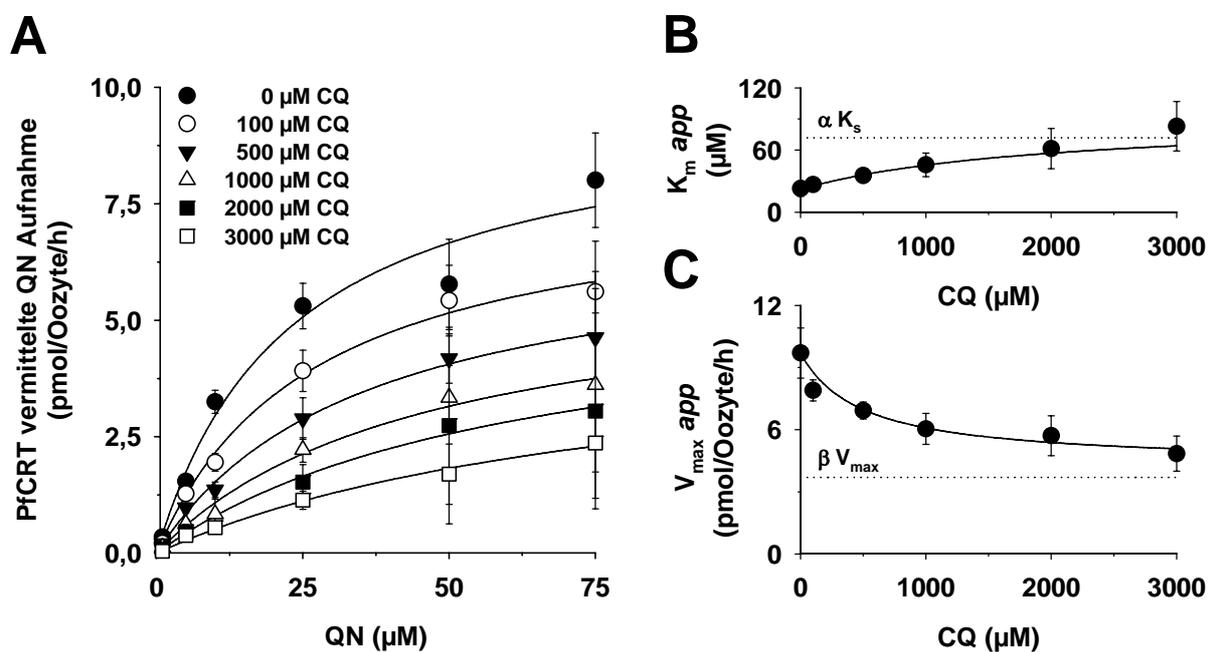


Abbildung 3.6.: Transportkinetik von PfCRT^{Dd2} für QN unter Zugabe von CQ

(A) PfCRT^{Dd2} vermittelte QN Aufnahme in Abhängigkeit steigender Konzentration des konkurrierenden Substrates CQ. Wie im vorigen Versuch nehmen mit ansteigender Konzentration des konkurrierenden Substrates (B) K_m -Werte hyperbolisch zu und streben wie im vorigen Versuch (Abbildung 3.4.) gegen den Grenzwert αK_s . (C) V_{max} -Werte nehmen hyperbolisch ab und nähern sich dem Grenzwert βV_{max} an. Einzelne Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Michaelis-Menten Kurven, K_m - und V_{max} -Werte und die entsprechenden Faktoren α und β wurden mittels SigmaPlot 11.0[®] bzw. SigmaPlot 12[®] ermittelt.

Aus den sechs Kurven für die jeweiligen CQ-Konzentrationen resultieren wie im vorigen Versuch verschiedene K_m - und V_{max} -Werte, welche als Funktion der CQ-Konzentration aufgetragen wurden. Auch hier nimmt der $K_m(QN) = 21,92 \pm 3,52$ mit ansteigender Konzentration des konkurrierenden Substrates, nun CQ, hyperbolisch zu und nähert sich dem Grenzwert $\alpha K_S = 71,82 \pm 38,11 \mu\text{M}$, was wieder den Faktor $\alpha = 3,28 \pm 1,66$ liefert (Abbildung 3.6. B). $V_{max}(CQ) = 9,22 \pm 0,55 \text{ pmol/Oozyte/h}$ nimmt hyperbolisch ab und strebt gegen den Grenzwert $\beta V_{max} = 3,27 \pm 0,99 \text{ pmol/Oozyte/h}$, woraus sich der Faktor $\beta = 0,35 \pm 0,11$ ergibt (Abbildung 3.6. C), um welchen $V_{max}(QN)$ auf sein Minimum $V_{min}(QN)$ reduziert wird (Segel, 1993).

Vergleicht man den βV_{max} -Wert aus dem vorigen, inversen Versuche mit diesem ($\beta V_{max}(CQ) = 3,27 \pm 1,85 \text{ pmol/Oozyte/h}$ und $\beta V_{max}(QN) = 3,27 \pm 0,99 \text{ pmol/Oozyte/h}$), ist kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Auch hier wurden die Kurven linearisiert und die Steigung der erhaltenen Geraden als Funktion der CQ-Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.7.).

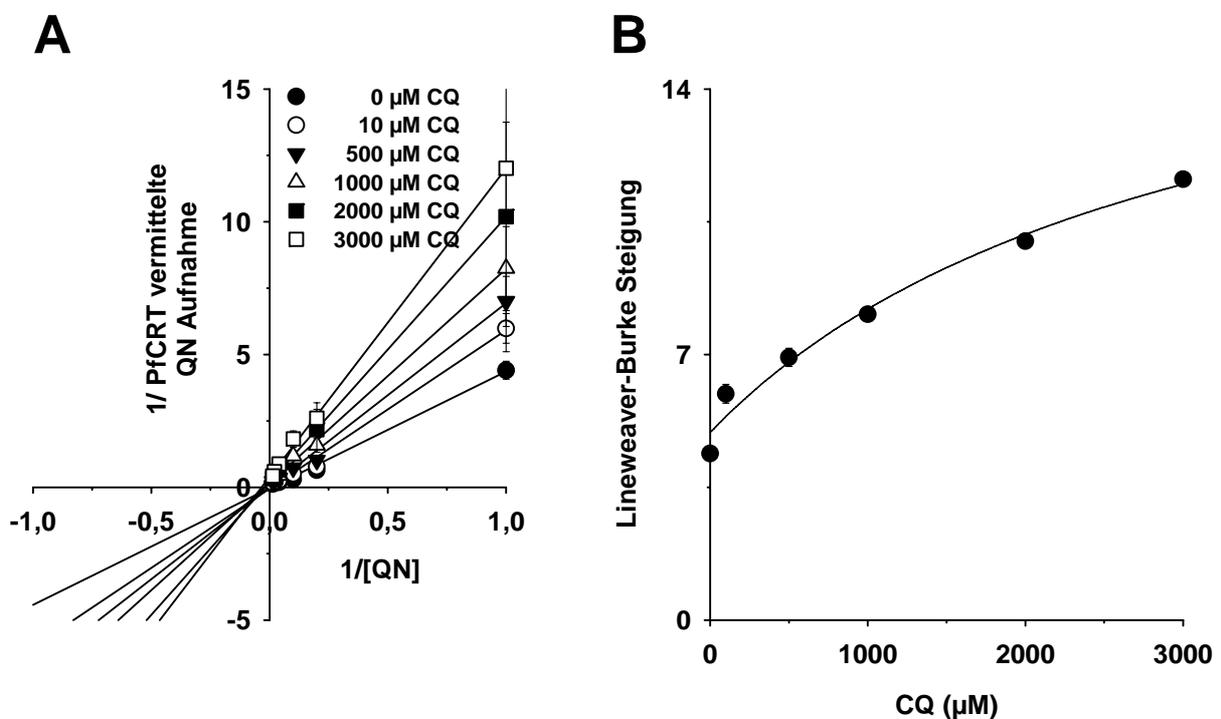


Abbildung 3.7.: Lineweaver-Burke Geraden und die entsprechende Steigung als Funktion von [CQ]
 (A) Lineweaver-Burke Darstellung von Abbildung 3.6. Geraden schneiden sich im dritten Quadranten. (B) Steigung der Geraden nimmt mit ansteigender CQ-Konzentration hyperbolisch zu. Beides deutet wieder auf eine partiell gemischte Inhibition hin.

Wie im vorigen Versuch treffen sich die Geraden wieder in einem Schnittpunkt im dritten Quadranten (unten links) (Abbildung 3.7. A) und die entsprechende Steigung nimmt hyperbolisch zu (Abbildung 3.7. B). Wieder deuten die Ergebnisse auf einen Mechanismus hin, bei welchem die zwei konkurrierenden Substrate zufällig und unabhängig voneinander an unterschiedliche Bindetaschen binden (Stein, 1986).

Die Ergebnisse der Kompetitionsversuche wurden in einem Gesamtüberblick zusammenfassend dargestellt (Abbildung 3.8.). Hierbei wurde die jeweilige Substrataufnahme als Funktion der Konzentration von eigentlichem und konkurrierendem Substrat in einem 3-dimensionalen Schaubild aufgetragen und damit nochmals der gegenseitige Einfluss von CQ und QN auf die PfCRT^{Dd2} vermittelte Substrataufnahme veranschaulicht. Die schwarzen Punkte stellen hierbei die empirisch ermittelten Werte dar, die roten Kurven sind die nach der unten aufgeführten Gleichung für die partiell gemischte Inhibierung (Segel, 1993) errechnet worden. Empirisch und mathematisch ermittelte Daten stimmen sehr gut überein (Abbildung 3.8.) und untermauern damit zusätzlich die Hypothese dieses Inhibierungs-Typs.

Gleichung für partiell gemischte Inhibierung:
$$v = \frac{v_{\max} (\beta I + \alpha K_i) S}{I S + \alpha K_i S + \alpha K_s I + \alpha K_i K_s}$$

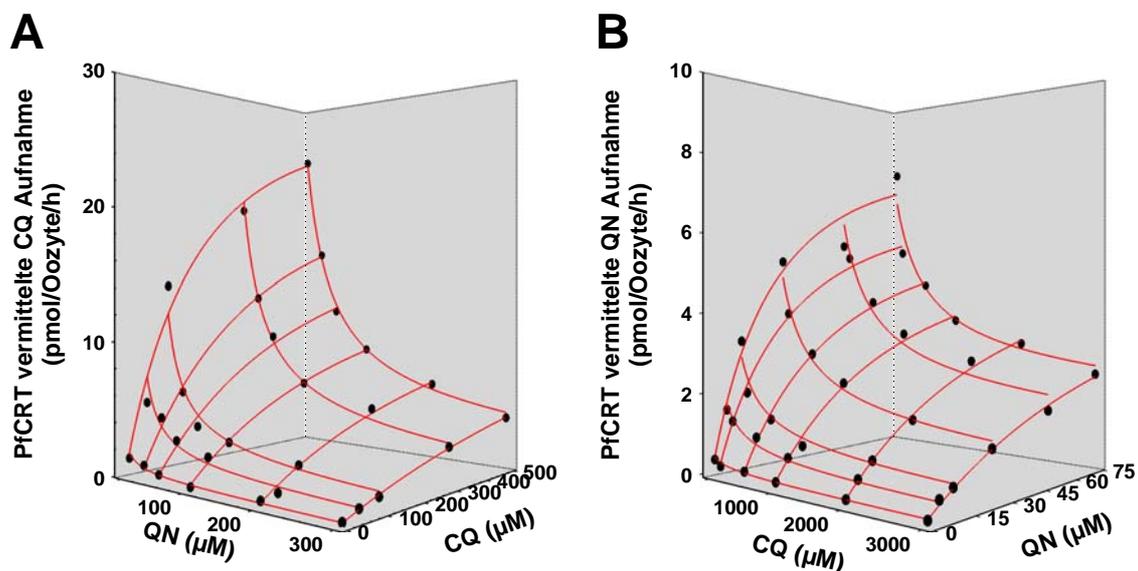


Abbildung 3.8.: Gegenseitiger Einfluss von CQ und QN auf die jeweilige PfCRT^{Dd2} vermittelte Substratakkumulation

(A) Einfluss von QN auf die PfCRT^{Dd2} vermittelte CQ Aufnahme und umgekehrt (B) Auswirkung auf die PfCRT^{Dd2} vermittelte QN Aufnahme unter Zugabe verschiedener CQ-Konzentrationen. In beiden Fällen stimmen die empirisch (schwarze Punkte) und die mathematisch ermittelten Daten (rote Kurven) sehr gut überein und stützen damit zusätzlich die Hypothese der partiell gemischten Inhibierung.

Die bisherigen Analysen haben einen Einblick in die mechanistischen Grundzüge der kinetischen Eigenschaften des membranständigen Transportproteins PfCRT gewährt. Worin aber besteht die strukturelle Grundlage dafür? Durch gezielte Mutagenese von Aminosäuren sollte diese Frage angegangen werden.

Die Aminosäure an Position 76 ist bekanntlich von essentieller Wichtigkeit für den Transport von Chinolinen und PfCRT^{K76T} ist in nahezu allen CQR *P. falciparum* Stämmen konserviert (Chen *et al.*, 2003, Lakshmanan *et al.*, 2005, Valderramos *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurde zunächst diese Aminosäureposition genauer untersucht.

3.3. Untersuchung der Aminosäure an Position 76 in PfCRT

3.3.1. Transport von CQ, QN und QD durch PfCRT Dd2^{T76X}

Es ist bekannt, dass die Aminosäure an Position 76 in PfCRT für die Resistenz gegen CQ eine entscheidende Rolle spielt (Cooke *et al.*, 1995, Lakshmanan *et al.*, 2005, Mita *et al.*, 2003). Im CQ sensitiven *P. falciparum* Stamm HB3 befindet sich an dieser Position ein Lysin (K). In den meisten resistenten Stämmen ist an dieser Stelle ein Threonin (T) konserviert. Allerdings sind auch Fälle von resistenten Stämmen bekannt, bei welchen das Lysin durch ein Asparagin (N) oder durch ein Alanin (A) substituiert ist. In beiden Fällen – K76N in Pusuk, Indonesien (Huaman *et al.*, 2004) und K76A in Thailand (Chaijaroenkul *et al.*, 2011) – konnte VP-reversible CQ-Resistenz nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass der Austausch von K76 durch T, N oder A, also durch ungeladene Aminosäuren, eine VP-reversible CQ-Resistenz in den entsprechenden *P. falciparum* Stämmen vermittelt, erhärtet den Verdacht, dass die positive Ladung des Lysins den Transport des in der Nahrungsvakuole zweifach protonierten CQ verhindert bzw. die Effizienz des Transports enorm herabsetzt (Chaijaroenkul *et al.*, 2011, Huaman *et al.*, 2004). Um nun zu überprüfen, welche Rolle die Aminosäure 76 für den Transport von CQ, QN und QD spielt, wurde in PfCRT^{Dd2} T76 sukzessive durch die 19 restlichen proteinogenen Aminosäuren ersetzt und in Oozyten exprimiert. Diese wurden anschließend für Transportstudien mit CQ, QN und QD verwendet (siehe hierzu Abschnitt 2.2.4.). Abbildung 3.9. zeigt das Ergebnis der Aufnahmestudien für alle PfCRT Dd2^{T76X} Varianten mit CQ, QN und QD.

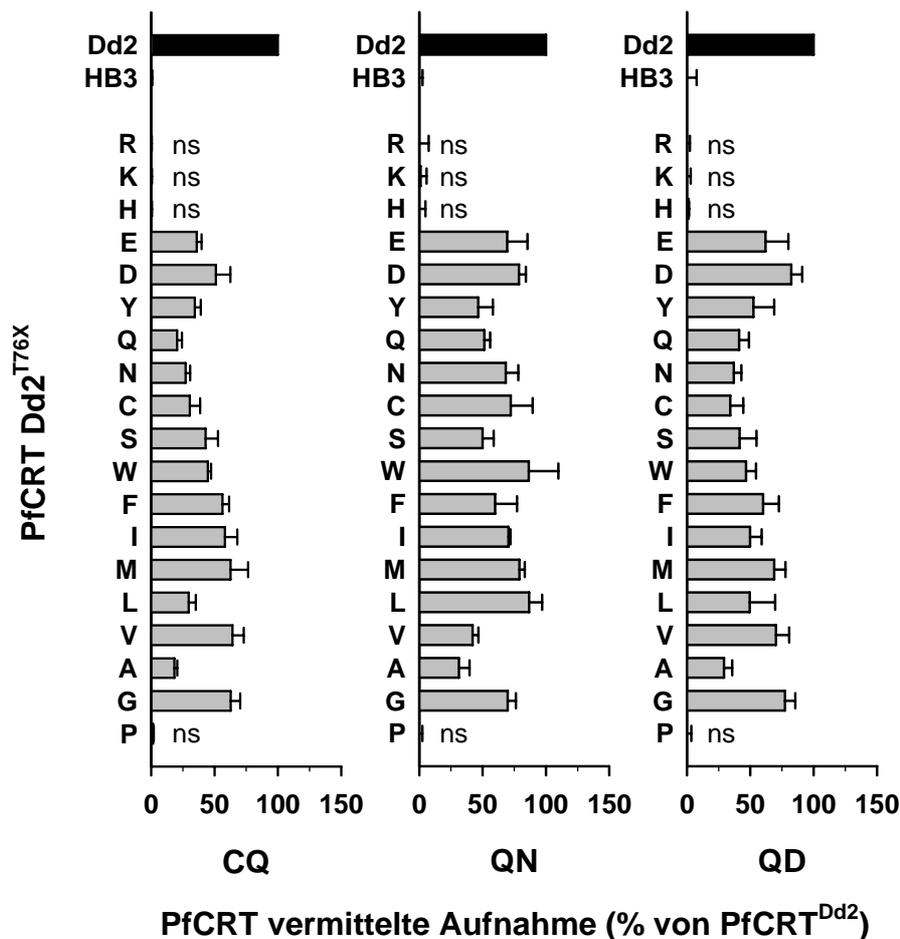


Abbildung 3.9.: Aktivität der PfCRT Dd2^{T76X} Varianten

Oozyten wurden mit cRNA von PfCRT^{Dd2} (Positivkontrolle), PfCRT^{HB3} und mit Wasser (Negativkontrollen) injiziert. Außerdem wurden 19 weitere PfCRT^{Dd2} Varianten mit veränderter Aminosäure T76 injiziert. Die PfCRT vermittelte Aufnahme der Substrate ist in Relation zu der aufgenommenen Menge durch PfCRT^{Dd2} in % dargestellt. Alle PfCRT Dd2^{T76X} Varianten, außer diejenigen, bei welchen T76 durch Prolin (Helix-Brecher) oder durch positiv geladene Aminosäuren (R, K oder H) ersetzt worden war, vermitteln mit $p < 0,01$ (student's t-Test) eine signifikant höhere Substratakkumulation im Vergleich zur Negativkontrolle PfCRT^{HB3}. Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Versuchen (ns = nicht signifikant).

Zur Darstellung der PfCRT vermittelten Akkumulation des jeweiligen Substrates wurde die Differenz zwischen Kontrolloozyten und die einzelnen PfCRT Dd2^{T76X} Varianten exprimierenden Oozyten ermittelt und anschließend mit der PfCRT^{Dd2} vermittelten Akkumulation normalisiert, d. h. sie wurden in prozentualer Relation dazu dargestellt. So können die Ergebnisse für CQ, QN und QD miteinander verglichen werden.

Die Substitutionen durch K, R, H (positiv geladene Aminosäuren) und P (\rightarrow Helix-Brecher) vermitteln keine Akkumulation von CQ, QN oder QD (ns = nicht signifikant), was die oben erwähnte Vermutung bestätigt, dass die positive Ladung an Position 76 den Transport von CQ, QN und QD verhindert. Im Falle von T76P liegt der Verdacht nahe, dass das Protein in

diesem Bereich, der ersten Transmembrandomäne (TMD), nicht korrekt gefaltet werden kann (Ringstruktur im Prolin verhindert das Einfügen in eine Helix), was die Funktionalität des Proteins schwerwiegend beeinträchtigt. Alle anderen Substitutionen vermitteln im Vergleich zu PfCRT^{HB3} eine signifikant höhere Akkumulation ($p < 0,01$, student's t-Test).

Um mögliche quantitative Unregelmäßigkeiten der membranständigen Expression der PfCRT Varianten auszugleichen, wurde für die Daten der Substrataufnahme durch die PfCRT Dd2^{T76X} Varianten (Abbildung 3.9.) der jeweilige Quotient ermittelt (QN/CQ, QD/CQ und QN/QD). Auf diese Weise wurden die Daten hinsichtlich der Expression normalisiert und mögliche stereospezifische Effekte der Substrate zutage gebracht. Die Substitutionen R, K, H und P sind für alle drei Substrate inaktiv (Abbildung 3.10.).

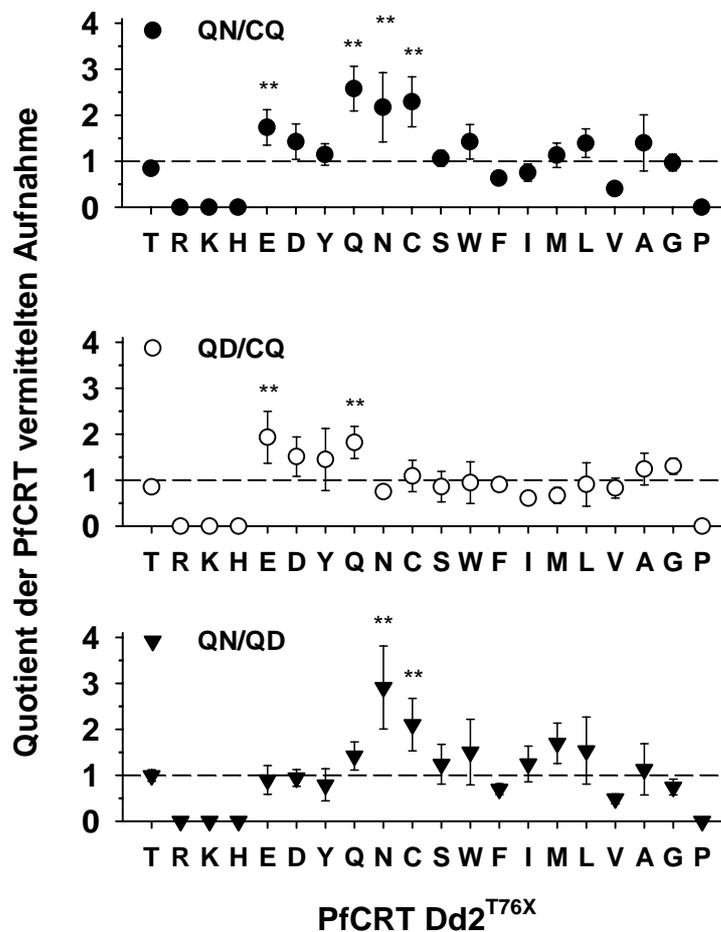


Abbildung 3.10.: PfCRT Dd2^{T76X} vermittelte Aufnahme von CQ, QN und QD in Relation zueinander
 Diese Darstellung der Substrataufnahme normalisiert mögliche Unterschiede in der membranständigen Expression der PfCRT Varianten und bringt stereospezifische Effekte zwischen QN und QD zum Vorschein. (** = $p < 0,01$, nicht gekennzeichnete Varianten = nicht signifikant)

Im Falle der Aminosäuresubstitutionen, bei welchen keine Substrataufnahme vermittelt wurde (R, K, H und P), liegt der jeweilige Quotient bei 0 (Abbildung 3.10.). In den meisten Fällen stieg oder fiel die Aufnahme für alle drei Substrate im Verhältnis zur PfCRT^{Dd2} vermittelten Aufnahme gleichermaßen. Für die Substitutionen durch Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Asparagin (N) und Cystein (C) hingegen war die QN Aufnahme signifikant höher als die von CQ (Abbildung 3.10., obere Graphik). Eine signifikant erhöhte Aufnahme von QD im Vergleich zu CQ war im Falle von Glutamin (Q) und Glutaminsäure (E) zu erkennen (Abbildung 3.10., mittlere Graphik). Ein stereospezifischer Effekt zwischen QN und QD entstand durch den Austausch von T76 gegen Asparagin (N) und Cystein (C) (Abbildung 3.10., untere Graphik), wodurch die QN Aufnahme im Vergleich zur der von QD begünstigt wurde und somit auf eine stereospezifische Interaktion hindeutet. Die Signifikanzen der unterschiedlichen Aufnahmeraten des jeweiligen Substrates wurden mittels student's t-Test ermittelt und liegen in jedem gekennzeichneten (**) Fall bei $p < 0,01$.

3.3.2. Einfluß von Mutationen in T76 auf die Transportkinetik von PfCRT^{Dd2}

Es konnte gezeigt werden, dass die Substitution von T76 durch alle anderen proteinogenen Aminosäuren eine mehr oder weniger große Auswirkung auf die PfCRT vermittelte Akkumulation des jeweiligen Substrates hat (Abbildung 3.9. und 3.10.). Um zu überprüfen, ob diese Substitutionen auch die Transportkinetik von PfCRT^{Dd2} beeinflussen, wurden einige repräsentative PfCRT Dd2^{T76X} Varianten ausgewählt und in Oozyten exprimiert. Hierfür wurde T76 durch Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften ersetzt, um ein weites Spektrum an Charakteristika abzudecken. Folgende Aminosäuren wurden für diese Untersuchung gewählt: Isoleucin (I, unpolar), Asparaginsäure (D, negativ geladen), Serin (S) und Asparagin (N) (beide ungeladen polar) und Tryptophan (W, unpolar aromatisch). Nach einer Expressionszeit von 72 Stunden wurden anschließend konzentrationsabhängige Aufnahmestudien mit CQ durchgeführt.

Die CQ Aufnahme wurde bei sieben verschiedenen CQ-Konzentrationen (1 μM – 1000 μM) im externen Aufnahmebuffer in PfCRT exprimierenden und mit H₂O injizierten Oozyten gemessen. Die aus der Differenz davon errechnete PfCRT vermittelte CQ Akkumulation (pmol/Oozyte/h) der jeweiligen PfCRT Variante wurde gegen die CQ-Konzentration als Michaeli-Menten Kurve im selben Graphen aufgetragen (Abbildung 3.11. A). Die daraus resultierenden K_m - und V_{max} -Werte sind in Abbildung 3.11. B dargestellt.

Die jeweiligen Substitutionen von T76 haben keine Veränderung des K_m -Wertes zur Folge, verursachen jedoch signifikante Unterschiede im Vergleich zu PfCRT^{Dd2} (T) in V_{max} . (Abbildung 3.11 B, ** = $p < 0,01$, student's t-test).

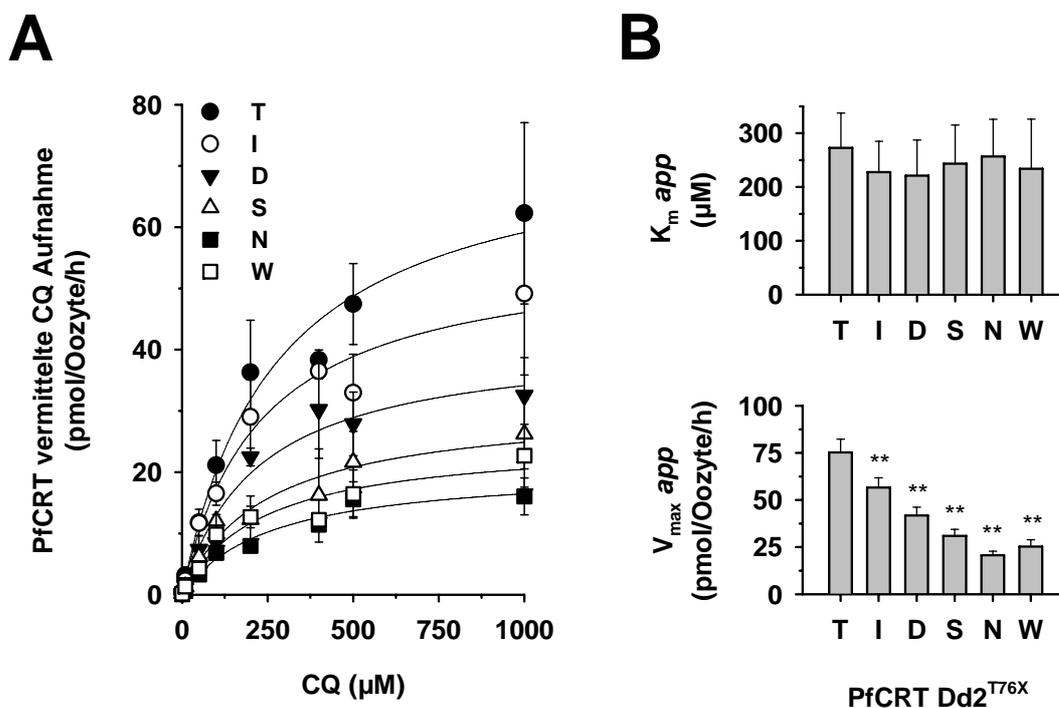


Abbildung 3.11.: Veränderungen der Transportkinetik von PfCRT^{Dd2} für CQ durch Mutationen in T76
 Oozyten wurden mit cRNA von PfCRT^{Dd2}, von den verschiedenen PfCRT Dd2^{T76X} Varianten und mit Wasser (Negativkontrolle) injiziert. Nach einer Expressionszeit von 72 Stunden bei 18°C wurden diese für Aufnahmestudien mit CQ verwendet. (A) Michaelis-Menten Kurven zeigen die PfCRT vermittelte CQ Aufnahme in Abhängigkeit der steigenden CQ-Konzentration. (B) Zwischen den K_m -Werten der einzelnen PfCRT Dd2^{T76X} Varianten sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar, die V_{max} -Werte hingegen unterscheiden sich signifikant (** = $p < 0,01$, student's t-Test) von PfCRT^{Dd2} (T). Einzelne Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Michaelis-Menten Kurven, K_m - und V_{max} -Werte wurden mittels SigmaPlot 11.0[®] bzw. SigmaPlot 12.0[®] ermittelt.

Um diese Beobachtungen zu untermauern, wurden auch hier die Michaelis-Menten Kurven doppelt reziprok aufgetragen und so durch das Lineweaver-Burke Verfahren linearisiert (Abbildung 3.12.). Die Geraden schneiden sich, wenn auch nur knapp, auf der negativen x-Achse und haben einen positiven y-Achsen-Abschnitt, wobei dieser sich umgekehrt proportional zur maximalen Umsatzrate V_{max} verhält (Abbildung 3.11 B). Dies bestätigt die Beobachtung, dass die Substitutionen in T76 den K_m -Wert unverändert lassen, V_{max} hingegen herabsenken. Der Austausch von T76 hat also für die untersuchten Varianten keine

Auswirkung auf die Affinität für CQ. Die Transporteffizienz jedoch sinkt in allen Fällen relativ zu PfCRT^{Dd2} in mehr oder weniger starkem Ausmaß signifikant ab.

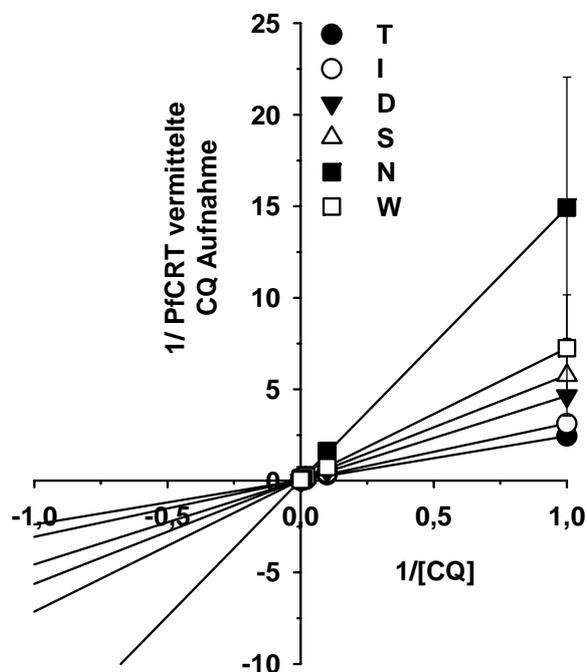


Abbildung 3.12.: Lineweaver-Burke Darstellung für den Effekt auf die Transportkinetik von PfCRT^{Dd2} durch Austausch von T76

Die Geraden schneiden sich auf der negativen Seite der x-Achse, haben aber verschiedene Schnittpunkte mit der y-Achse. Die Unterschiede der y-Achsen-Abschnitte verhalten sich umgekehrt proportional zu den entsprechenden V_{\max} -Werten und bestätigen somit die Beobachtungen aus Abbildung 3.11. B.

Aminosäure 76 spielt – wie bereits erwähnt – eine tragende Rolle für die Resistenz von *P. falciparum*, vor allem gegen CQ, hat aber offensichtlich keinen Einfluss auf die Affinität des Transporters, wohl aber auf die Transporteffizienz. PfCRT^{Dd2} trägt im Vergleich zum Wildtyp PfCRT^{HB3} noch sieben weitere Mutationen in seiner Sequenz. Wie also wirken sich diese in Bezug auf den PfCRT^{Dd2} vermittelten Substrattransport aus? Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine Reihe von weiteren PfCRT Varianten durch gezielte Mutagenese generiert und die dadurch vermittelte Substrataufnahme von CQ, QN und QD ermittelt. So konnte ein Einblick in die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für den Transport gewonnen werden. Außerdem konnten auf diese Weise Rückschlüsse darauf gezogen werden, welche Aminosäuren am Aufbau der Substratbindetaschen für CQ und QN beteiligt sind.

3.4. Rückmutationen spezifischer Aminosäuren in PfCRT verändern dessen Transporteigenschaften für CQ, QN und QD

Um die Bedeutung der Aminosäuren an anderer Position als 76 zu untersuchen wurden diese zielgerichtet einzeln oder in verschiedenen Kombinationen zueinander in die entsprechende Aminosäure der Wiltypvariante PfCRT^{HB3} rückmutiert und die dadurch vermittelte Substrataufnahme ermittelt. Auf diese Weise konnten weitere Erkenntnisse über die Funktionsweise von PfCRT gewonnen werden.

3.4.1. Aufnahme von CQ, QN und QD durch PfCRT^{GB4} Varianten

In der PfCRT Variante des CQ resistenten Stammes GB4 sind die Aminosäuren 326 und 356 mit der von PfCRT^{HB3} identisch, die dadurch vermittelte Aufnahme von CQ, QN und QD jedoch ist mindestens genauso hoch wie die durch PfCRT^{Dd2}. Diese Positionen haben also offensichtlich keine große Bedeutung für den Transport. Aufgrund dessen wurden auf der Grundlage von PfCRT^{GB4} mehrere Varianten generiert, weil dadurch die systematische Mutagenese vereinfacht wurde.

Ebenso wie Position 326 und 356 kann Position 74 ohne Einbußen der Aktivität rückmutiert werden (Abbildung 3.13., G1). Die Rückmutation der Aminosäurepositionen 220, 271 und 371 (G3, G4 und G5) verursachen in verschiedenen Maßen einen Abfall der Aufnahme der Substrate. Mutiert man in diesen Varianten zusätzlich 74 zurück (G7, G8 und G9), sinkt die Aufnahme noch weiter ab. Interessanterweise ist für G9 die QN und QD Aufnahme doppelt so hoch wie in PfCRT^{Dd2}, die CQ Akkumulation hingegen erreicht nur knapp 70 % der durch PfCRT^{Dd2} vermittelten. Zusätzliche Rückmutationen (G10, G11, G12) bewirken weiter das Absinken der Substrate, behalten aber dennoch eine signifikante Akkumulationsaktivität bei. Mit nur noch zwei Mutationen, E75 und T76, vermittelt G13 noch eine zwar geringe aber dennoch signifikante Substrataufnahme. E75N setzt die Aktivität des Transporters für alle drei Substrate auf das Niveau von PfCRT^{HB3} herab (G2 und G6).

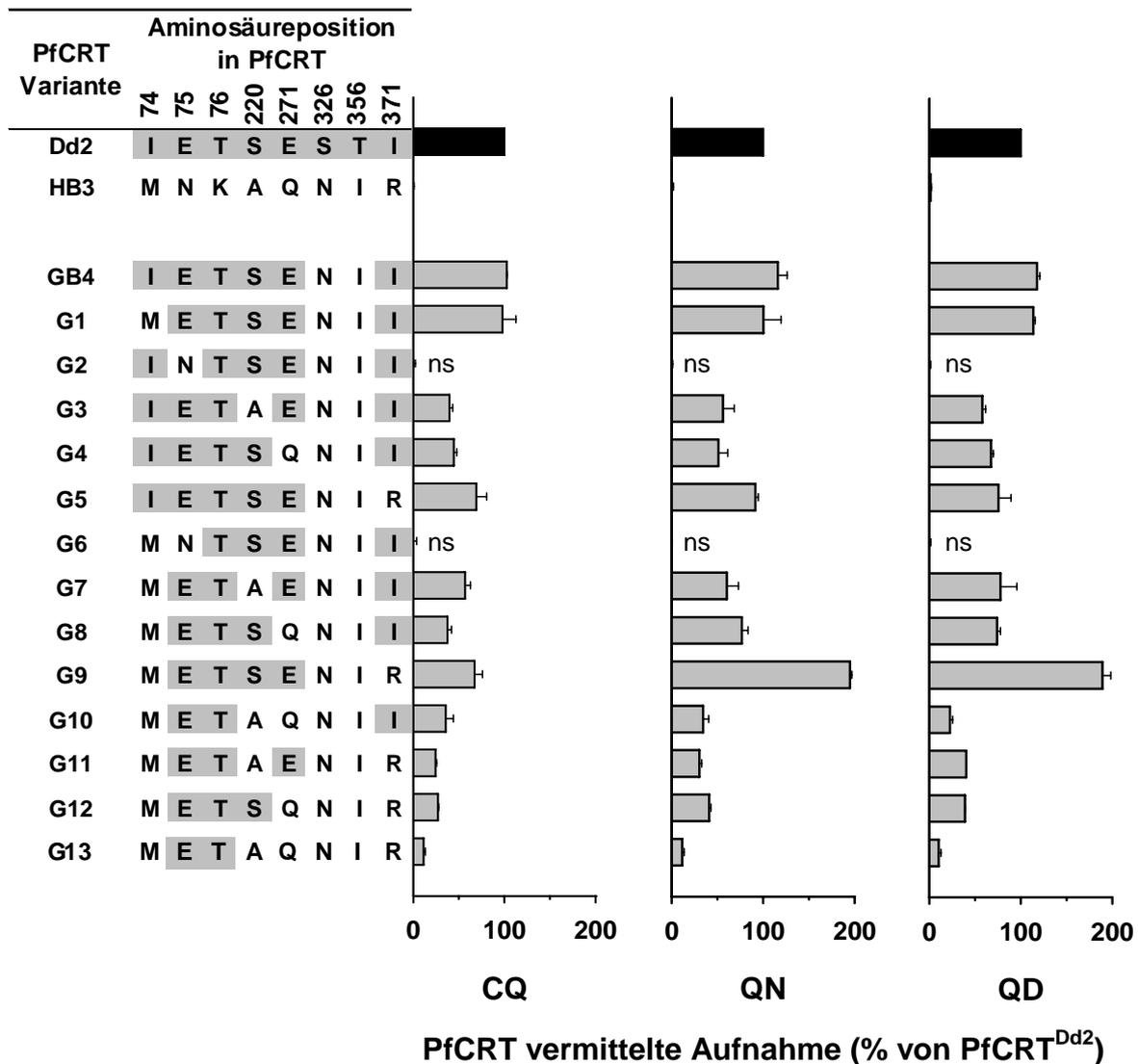


Abbildung 3.13.: Aktivität der PfCRT^{GB4} Varianten

Durch Rückmutation der in PfCRT^{Dd2} mutierten Aminosäuren wird die Aktivität des Transporters herabgesetzt. Bemerkenswert allerdings ist, dass Variante G9 zwar weniger CQ Aufnahme vermittelt, die von QD jedoch auf dem Niveau von PfCRT^{Dd2} hält und sogar doppelt so viel Akkumulation von QN bewirkt. Die Mutationen N75E und K76T reichen für eine geringe aber signifikante Aufnahme aus. Für alle PfCRT Varianten, außer G2 und G6, wurden Signifikanzen der jeweiligen Aufnahme mit $p < 0,01$ (student's t-Test) im Vergleich zu PfCRT^{HB3} ermittelt.

Auch hier wurde wie für die PfCRT Dd2^{T76X} Varianten der jeweilige Quotient der Substrataufnahme ermittelt (QN/CQ, QD/CQ und QN/QD), um so eventuelle quantitative Unregelmäßigkeiten der membranständigen Expression der GB4 Varianten auszugleichen (Abbildung 3.14.). Dadurch wurden die Ergebnisse bezüglich der Expression normalisiert, stereospezifische Effekte zwischen QN und QD sind allerdings nicht zu erkennen. Lediglich für die Varianten G8 und G9 ist die Akkumulation von QN und QD signifikant höher als die von CQ (Abbildung 3.14.).

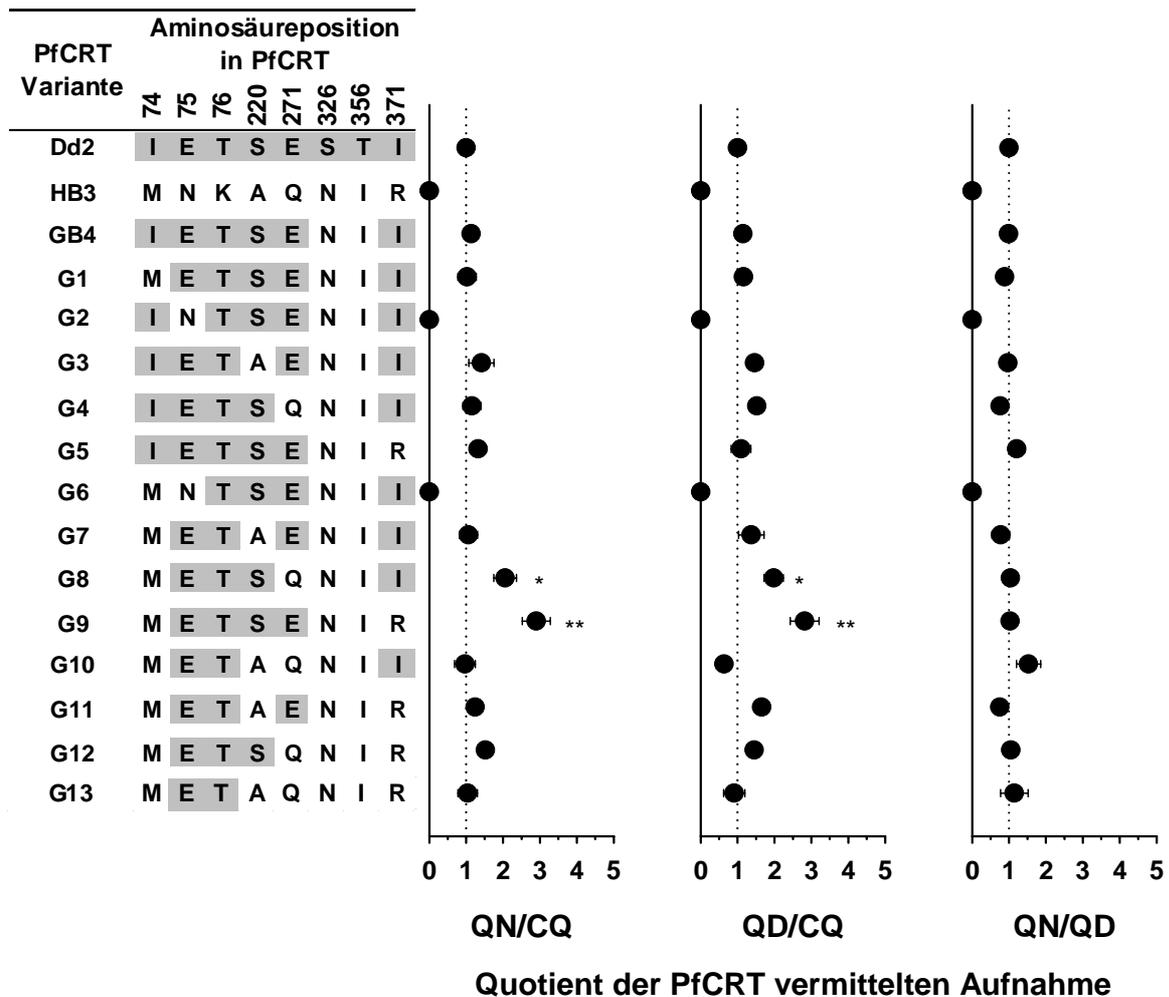


Abbildung 3.14.: Substrataufnahme durch PfCRT^{GB4} in Relation zueinander

Normalisierung der Substrataufnahme, um mögliche Unterschiede in der membranständigen Expression der PfCRT Varianten auszugleichen. Die Varianten G8 und G9 akkumulieren signifikant mehr QN und QD als CQ. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, nicht gekennzeichnete Varianten = nicht signifikant)

3.4.2. Aufnahme von CQ, QN und QD durch PfCRT^{Ecu1110} Varianten

In einer vorangegangenen Arbeit konnte – ebenfalls mittels *X. laevis* Oozyten – nachgewiesen werden, dass die PfCRT Variante des natürlich vorkommenden *P. falciparum* Stammes Ecu1110 zwar CQ Akkumulation (Dave, 2011), jedoch keinerlei Aufnahme von QN und QD vermittelt. Auf dieser Grundlage basierend wurden deshalb weitere PfCRT Varianten generiert, mit dem Ziel, eine oder mehrere Varianten zu finden, welche die Fähigkeit erlangen, die Substrate QN und/oder QD zu transportieren.

Die Aktivität der neuen Varianten wurde getestet, jedoch konnte in keinem Fall eine neu gewonnene Aktivität für QN oder dessen Isomers QD erreicht werden (Abbildung 3.15.).

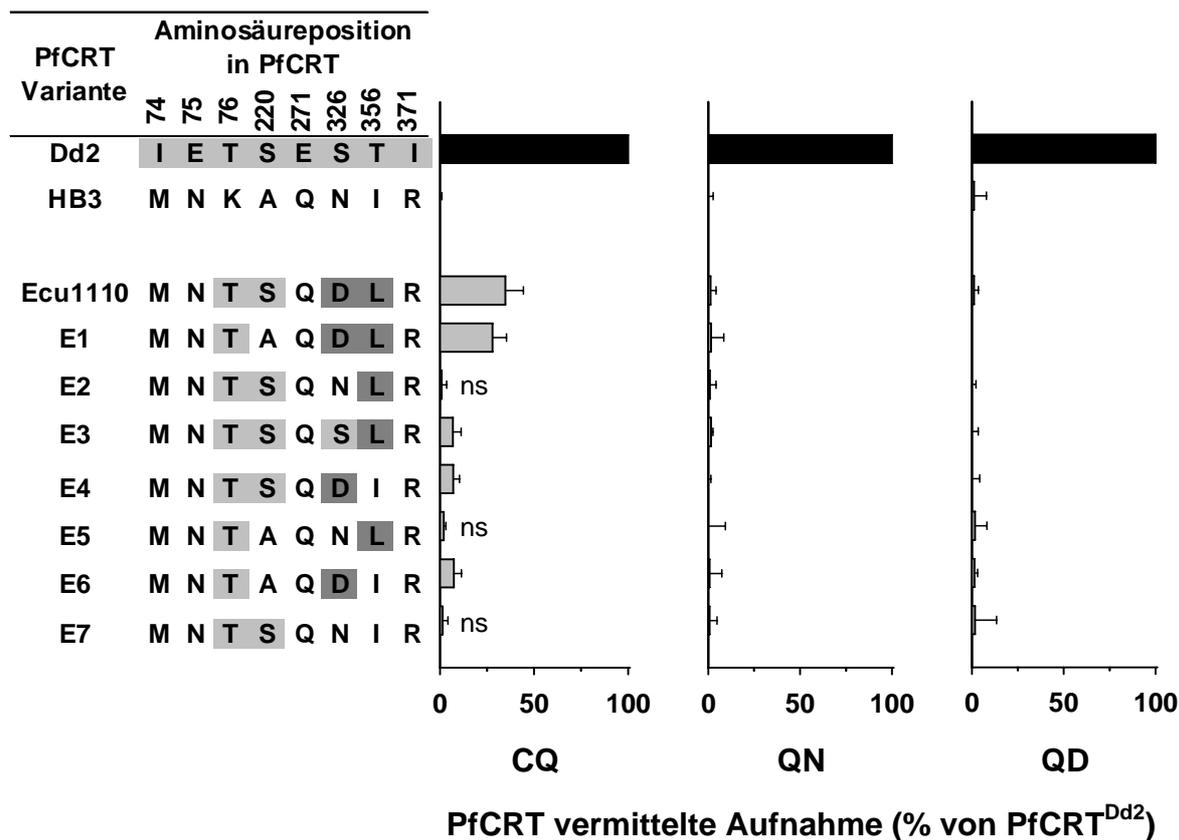


Abbildung 3.15.: Aktivität der PfCRT^{Ecu1110} Varianten

Keine der auf PfCRT^{Ecu1110} basierenden Varianten konnte QN oder QD Aufnahme vermitteln. Die Aufnahme von CQ war für die Varianten Ecu1110, E1, E3, E4 und E6 im Vergleich zu PfCRT^{HB3} mit $p < 0,01$ signifikant (student's t-Test; ns = nicht signifikant).

Die PfCRT vermittelte CQ Aufnahme ist für die Ecu1110 Variante auf etwa 40 % der Dd2 Variante reduziert, E1 (Abbildung 3.15.) mit der Rückmutation S220A befindet sich auf demselben Niveau wie PfCRT^{Ecu1110}. Diese Rückmutation hat also offenbar keinen Einfluss auf die Transportaktivität dieser PfCRT Variante. Die CQ Akkumulation durch die Varianten E3, E4 und E6 mit verschiedenen Mutationen wird auf knapp 10 % der durch PfCRT^{Dd2} bzw. auf 20 % - 25 % der durch PfCRT^{Ecu1110} vermittelten Aufnahme reduziert. Die Aufnahme durch die Varianten E2, E5 und E7 hingegen, bei welchen D326 gegen das in PfCRT^{HB3} vorkommende N ersetzt worden war, ist nicht signifikant, d. h. sie ist auf das Niveau der PfCRT Variante des CQ sensitiven Stammes HB3 gesunken. Interessanterweise bleibt aber eine zwar geringe aber im Vergleich zu PfCRT^{HB3} noch signifikante Restaktivität im Falle von E3 erhalten. Hier ist das D durch das S in PfCRT^{Dd2} ersetzt worden. Offensichtlich spielt D326 eine wichtige Rolle für die Funktionalität des Proteins, kann aber durch den Austausch D326S noch eine geringe Aktivität beibehalten.

Für die Ecu1110 Varianten konnte der jeweilige Quotient der Substrataufnahme nicht ermittelt werden (QN/CQ, QD/CQ und QN/QD), da durch diese Varianten weder die Akkumulation von QN noch QD vermittelt wurde.

Der entscheidende Unterschied zwischen den PfCRT^{GB4} und den PfCRT^{Ecu1110} Varianten liegt in den Positionen 74, 75, 326 und 356 (I74 E75 326N 356I in GB4 und M74 N75 D326 356L in Ecu1110). Aus diesem Grund wurden chimäre PfCRT Varianten generiert, deren erste Hälfte auf PfCRT^{Dd2} und die zweite auf PfCRT^{Ecu1110} basiert (und umgekehrt) und damit Aufnahmestudien mit CQ, QN und QD durchgeführt.

3.4.3. Aufnahme von CQ, QN und QD durch chimäre PfCRT Varianten

Wie in Abschnitt 1.8. schon erwähnt, wird PfCRT der “drug-metabolite-transporter“ Superfamilie zugeordnet und weist die dafür typische Pseudo-Symmetrie auf (Krishnamurthy *et al.*, 2009, Sanchez *et al.*, 2010). Diese zeichnet sich dadurch aus, dass eine signifikante Homologie zwischen den beiden Hälften des Proteins, d. h. zwischen den Transmembrandomänen (TMD) 1 - 5 und 6 - 10, besteht (Martin & Kirk, 2004). Diese interne Symmetrie ist in vielen, wenn nicht gar allen Transportern konserviert und bildet die Grundlage für den Schleuse-Mechanismus und die Transport Zyklen (Krishnamurthy *et al.*, 2009). Die Spiegelachse liegt in den mutierten Aminosäuren (Abbildung 3.16.) zwischen Position 76 und 220.

Um zu untersuchen, inwieweit sich eine eventuelle Interaktion zwischen den beiden Hälften von PfCRT auf die Transport-Aktivität des Proteins auswirkt, wurden chimäre Varianten des Transporters generiert, deren TMD 1 - 5 auf PfCRT^{Dd2} und 6 - 10 auf PfCRT^{Ecu1110} basierten und umgekehrt. Durch gezielte Mutagenese wurden zusätzliche Mutationen in diese chimären PfCRT Varianten eingeführt und so weitere Varianten hergestellt. Alle chimären PfCRTs wurden in Oozyten exprimiert, welche anschließend für Aufnahmestudien mit CQ, QN und QD verwendet wurden. Die jeweilige Akkumulation der einzelnen Substrate durch die PfCRT Varianten ist in Abbildung 3.16. dargestellt.

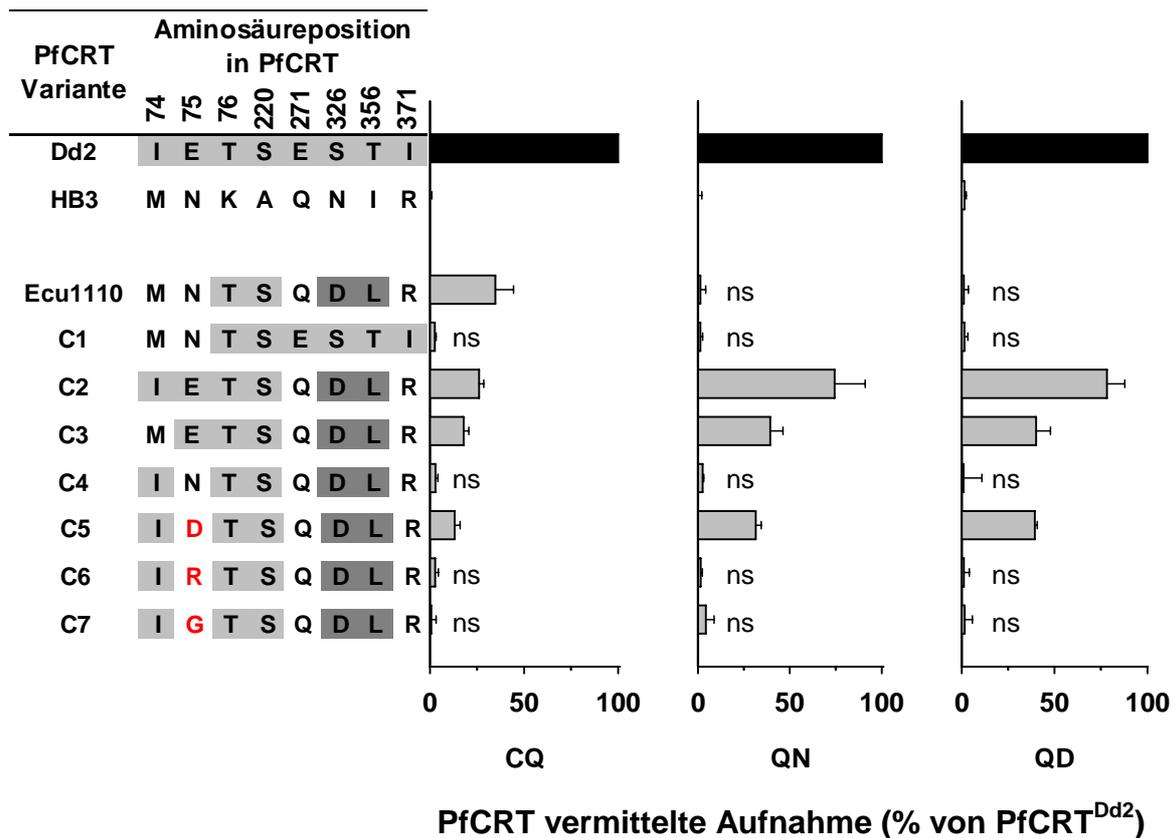


Abbildung 3.16.: Aktivität der chimären PfCRT Varianten

Die im Labor generierten PfCRT Varianten ohne negativ geladene Aminosäure an Position 75 vermitteln für keines der drei Substrate Aufnahme. Lediglich das natürlich vorkommende PfCRT^{Ecu1110} vermittelt wenigstens für CQ eine signifikante Aufnahme. Die Signifikanzen wurden mit dem student's t-Test ermittelt. Alle nicht mit ns (nicht signifikant) gekennzeichneten Varianten vermitteln im Vergleich zu PfCRT^{HB3} mit $p < 0,01$ signifikante Substrat-Akkumulation.

Die chimäre PfCRT Variante C1 (Abbildung 3.16.), deren erste Hälfte auf Ecu1110 und die zweite auf Dd2 basiert, zeigt für keines der Substrate eine signifikante Aufnahme. Im umgekehrten Fall C2 (erste Hälfte basiert auf Dd2 und die zweiten auf Ecu1110) erreicht die Aufnahme von CQ knapp das Niveau der natürlich vorkommenden Variante PfCRT^{Ecu1110}. Die Aufnahme von QN und QD steigert sich sogar bis auf ~75 % von PfCRT^{Dd2}. Die durch C3 vermittelte CQ Aufnahme sinkt im Vergleich zu C2 nur geringfügig ab, die Akkumulation von QN und QD sogar um über die Hälfte. In C6 wurde E75 (negativ geladen) durch R (positiv geladen) ersetzt, wodurch die Substrat-Akkumulation auf das Niveau von PfCRT^{HB3} gesenkt wurde. In C7 wurde diese Aminosäure durch C (kleinste Aminosäure) ersetzt, um auch auf sterische Hinderung hin zu untersuchen. Auch hier ist keine signifikante Aufnahme zu erkennen. C4 mit N75 vermittelt ebenfalls keine Substrat-Aufnahme. Die Aufnahme durch

C5 mit D75 liegt auf etwa demselben Niveau wie die von C3 mit E75. In beiden Fällen ist Aminosäure 75 negativ geladen.

Die Varianten ohne negativ geladene Aminosäure an Position 75 vermitteln für keines der Substrate Akkumulation, außer dem natürlich vorkommenden PfCRT^{Ecu1110}, welches wenigstens für CQ Aufnahme vermittelt. C3 und C5 besitzen an dieser Position eine negativ geladene Aminosäure und die dadurch vermittelte Akkumulation befindet sich für alle drei Substrate in etwa auf demselben Stand. Die negative Ladung an dieser Position spielt also offenbar eine wichtige Rolle für die Funktionalität des Transporters.

Um auch für die chimären PfCRT Varianten eventuelle quantitative Unregelmäßigkeiten der membranständigen Expression zu normalisieren wurde erneut der jeweilige Quotient der Substrataufnahme ermittelt (QN/CQ, QD/CQ und QN/QD) (Abbildung 3.17.). Wieder ist kein stereospezifischer Effekte zwischen QN und QD sichtbar. Allerdings wird durch die Varianten C2, C3 und C5 signifikant mehr QN und QD akkumuliert als CQ (Abbildung 3.17.).

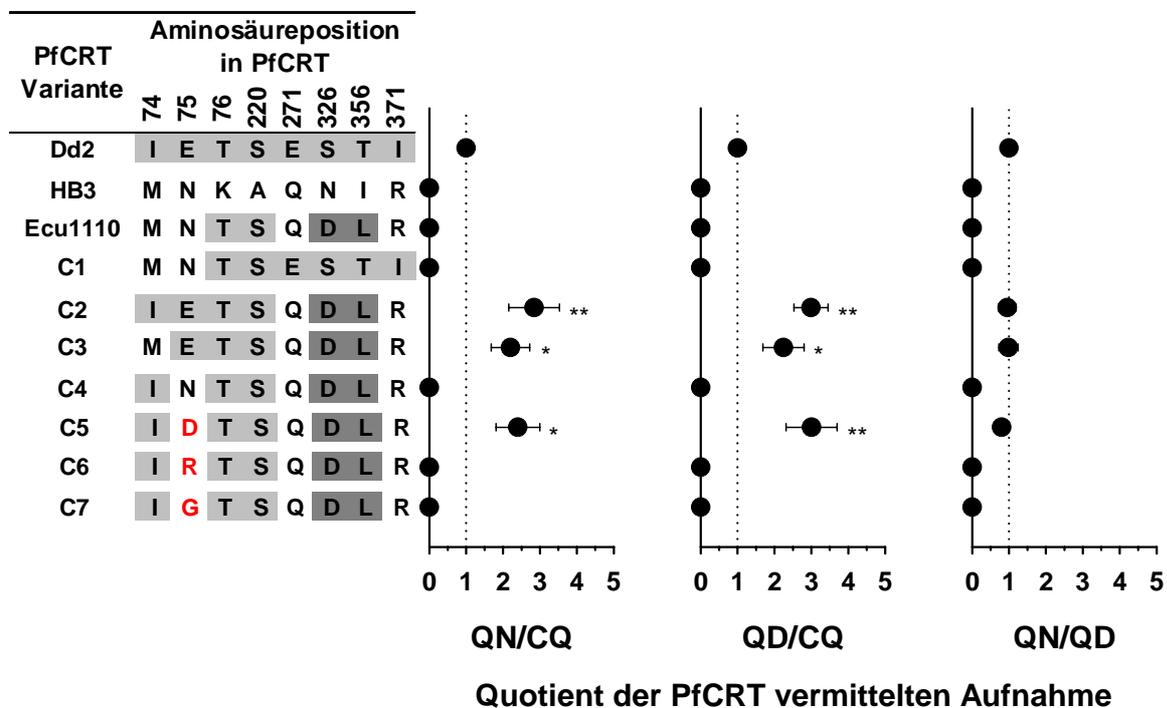


Abbildung 3.17.: Akkumulation von CQ, QN und QD durch die chimären PfCRT Varianten im Verhältnis zueinander

Normalisierung der Substrataufnahme um mögliche Unterschiede in der membranständigen Expression der PfCRT Varianten auszugleichen. Die Varianten G8 und G9 akkumulieren signifikant mehr QN und QD als CQ. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, nicht gekennzeichnete Varianten = nicht signifikant)

3.4.4. PfCRT^{Ecu1110} interagiert nicht mit QN

Das in Parasiten aus Südamerika natürlich vorkommende PfCRT^{Ecu1110} vermittelt unter den angewendeten Versuchsbedingungen in *X. laevis* Oozyten keine Aufnahme von QN und QD. Ebenso wenig tun dies die auf der Grundlage von PfCRT^{Ecu1110} generierten Varianten E1 - E7 (Abbildung 3.15.). Dies wirft die Frage auf, ob diese auf PfCRT^{Ecu1110} basierenden Varianten überhaupt mit den Substraten interagieren. Werden die Substrate nur nicht transportiert oder binden sie erst gar nicht in der entsprechenden Bindetasche? Oder ist aufgrund der Konfiguration der Mutationen eventuell die Bindetasche nicht mehr funktionell?

Um diese Fragestellung anzugehen, wurden die drei PfCRT Varianten Dd2, Ecu1110 und die aus diesen beiden zusammengesetzte chimäre Variante C2 (Abbildung 3.16.) in Oozyten exprimiert und für Aufnahmestudien verwendet. In dieser Untersuchung wurde die akkumulierte Menge CQ in den PfCRT exprimierenden Oozyten und in Kontrolloozyten (mit H₂O injiziert) gemessen und aus der daraus resultierenden Differenz die PfCRT vermittelte Akkumulation kalkuliert. In den vorigen Versuchen ist gezeigt worden, dass QN die PfCRT^{Dd2} vermittelte Aufnahme von CQ inhibiert (Abbildung 3.4.). Deshalb wurden acht verschiedene Aufnahmepuffer angesetzt (pH 6,0). In diesen wurde eine CQ-Konzentration von 50 µM mit 8 verschiedenen QN-Konzentrationen kombiniert (0 µM - 600 µM). Dadurch sollte überprüft werden, ob QN mit den verschiedenen PfCRT Varianten interagiert. Im Falle von Dd2 ist dies schon gezeigt worden (Abbildung 3.4.) und wurde daher als Positivkontrolle verwendet.

Die Variante PfCRT^{C2} vermittelt QN Akkumulation (Abbildung 3.16.) und sinnigerweise wird die Aufnahme von CQ durch QN gehemmt (Abbildung 3.18.). Die Aufnahme von CQ durch PfCRT^{Ecu1110} hingegen wird nicht durch QN inhibiert und spricht deshalb zusammen mit den Ergebnissen aus Abbildung 3.15. dafür, dass unter den beschriebenen Versuchsbedingungen (pH des Aufnahmepuffers: 6,0, Inkubationsdauer: 60 Minuten, Inkubationstemperatur: 25°C) keinerlei Interaktion zwischen dieser PfCRT Variante und QN stattfindet.

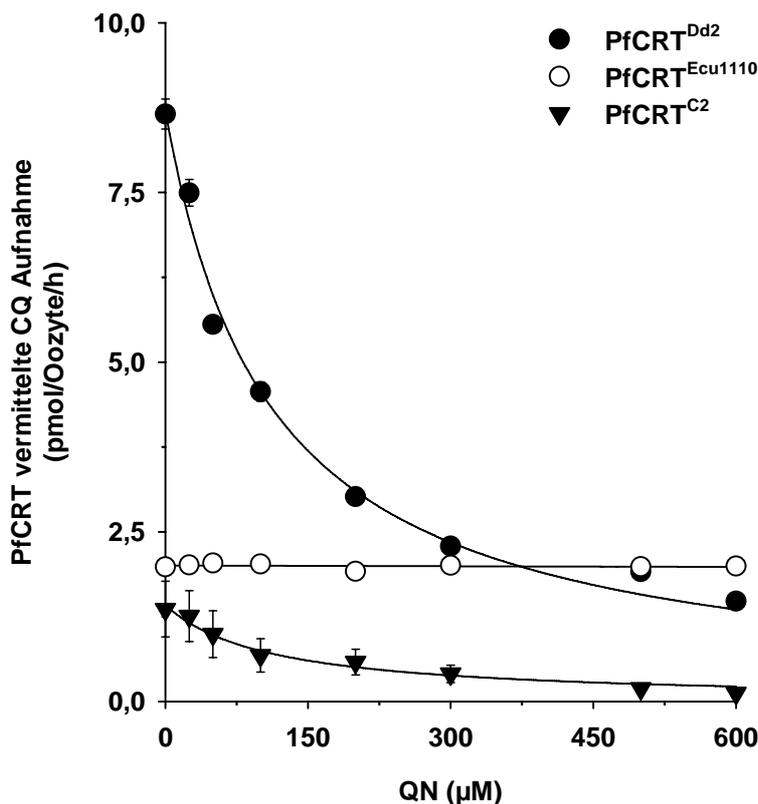


Abbildung 3.18.: Interaktion der PfCRT Varianten Ecu1110 und C2 mit QN

PfCRT^{Ecu1110} vermittelt keine QN Akkumulation und ebenso wenig hemmt QN die dadurch vermittelte Aufnahme von CQ.

Es konnte also gezeigt werden, dass PfCRT^{Ecu1110} nicht mit QN interagiert. Wahrscheinlich ist für die Interaktion die erste Hälfte des Transporters wichtig, was die Ergebnisse der chimären PfCRT Varianten, insbesondere PfCRT^{C2}, vermuten lassen (Abbildung 3.16. und Abbildung 3.18.). Um allerdings ein Gesamtverständnis für den Transportmechanismus von PfCRT zu gewinnen, müssen die bis hierhin gezeigten Ergebnisse als Gesamtsystem betrachtet werden. Auf diese Weise können Zusammenhänge zwischen Mutationen und Transportaktivität besser herauskristallisiert werden. Im folgenden Abschnitt soll ein solcher Gesamtüberblick gewährt werden, um eben diese Zusammenhänge besser zu verstehen.

3.4.5. Gesamtüberblick über die Auswirkung von Mutationen in PfCRT

Die Transportaktivität der jeweiligen PfCRT Varianten für die untersuchten Substrate CQ, QN und QD sind nur im Zusammenhang mit den ihnen zugrundeliegenden natürlich vorkommenden PfCRTs betrachtet worden. Beispielsweise wurden auf PfCRT^{GB4} basierend verschiedene Varianten des Transporters generiert (Abbildung 3.13.) und die dadurch jeweils

vermittelte Substratakkumulation miteinander verglichen. Ebenso wurde dies für die auf PfCRT^{Ecu1110} basierenden (Abbildung 3.15.) und die chimären PfCRT Varianten (Abbildung 3.16.) durchgeführt. In diesem Abschnitt soll ein Gesamtüberblick über den Zusammenhang von Mutationen in PfCRT und die daraus resultierenden Veränderungen in dessen Transportaktivität wiedergeben. In Abbildung 3.19. wird dies schematisch für die PfCRT vermittelte Akkumulation von QN veranschaulicht. Rote Pfeile zeigen hierbei eine Steigerung der Aktivität ausgehend von der Aminosäure der Wildtyp Variante PfCRT^{HB3} hin zu der mutierten Form in PfCRT^{Dd2}. Blaue Pfeile hingegen zeigen einen Abfall der Aktivität ebenfalls ausgehend von der Aminosäure in PfCRT^{HB3} hin zu der mutierten in PfCRT^{Dd2}. Einzige Ausnahme ist die Variante mit einer Aktivität von 70 % an zweiter Stelle von links, welche der Variante PfCRT^{C2} entspricht (Abbildung 3.16.). Hier geht der Pfeil von der in PfCRT^{Dd2} vorkommenden Glutaminsäure an Position 75 (E75) aus zu der an dieser Position nicht natürlich vorkommenden Asparaginsäure (D75) hin. Da diese beiden Aminosäuren eine negative Ladung besitzen, zielte das Einführen dieser Mutation (E75D) darauf ab, die Bedeutung der Ladung an dieser Position zu untersuchen (dazu wurde Glutaminsäure auch durch das positiv geladene Arginin (R) ersetzt (Abbildung 3.16., C6)). Gestrichelte Pfeile (rot bzw. blau) zeigen den Anstieg bzw. Abfall der Aktivität, wenn zwei Aminosäuren gleichzeitig von der HB3 Variante zu der Dd2 Variante mutiert werden. Erstaunlich ist die PfCRT Variante, welche über die höchste Aktivität verfügt (200 %), obwohl sie nur vier Mutationen besitzt (Abbildung 3.13., G9)). Die möglichen Hintergründe hierfür und für die Aktivitäts-Unterschiede der andern Varianten untereinander sollen aber nicht an dieser Stelle, sondern im folgenden Kapitel (4. Diskussion) neben allen anderen Ergebnissen ausführlich diskutiert werden. In Abbildung 3.19. sind nicht alle PfCRT Varianten, bei welchen die Aktivität auf 0 % gesunken war, aufgeführt. Zum einen würde dies die Übersichtlichkeit der Darstellung beeinträchtigen und zum anderen wäre dies nicht sehr sinnvoll, da beispielsweise alle auf PfCRT^{Ecu1110} basierenden Varianten keine Aktivität für QN gezeigt haben (Abbildung 3.15.). Auch das Miteinbeziehen der PfCRT Dd2^{T76X} Varianten (Abbildung 3.9.) in die Graphik wäre nicht sinnvoll bzw. zweckmäßig. Die Aktivität der aufgeführten PfCRT Varianten zeigt für QN und QD keine wesentlichen Unterschiede (siehe hierzu auch Abbildung 3.13 und 3.16.).

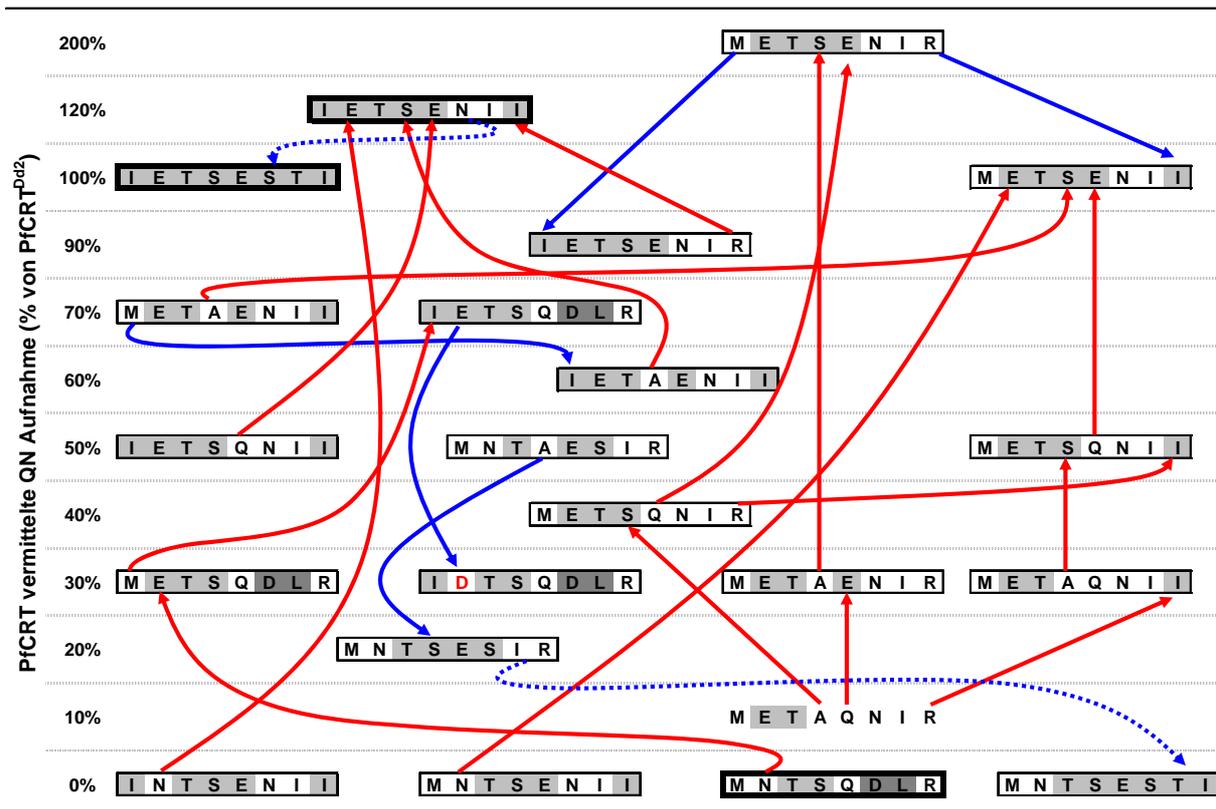


Abbildung 3.19.: Gesamtüberblick über den Einfluss von Mutationen in PfCRT auf dessen Akkumulationsaktivität für QN

Zusammenspiel von Mutationen in PCRT und der Veränderung in dessen Transportaktivität für QN. Die Werte für QD unterscheiden sich nicht grundlegend von denen für QN. Rote Pfeile symbolisieren einen Anstieg, blaue Pfeile einen Abfall der Aktivität. Gestrichelte Pfeile deuten auf die mit zwei Mutationen eingehende Veränderung der Aktivität hin. Die natürlich vorkommenden PfCRT Varianten in den *P. falciparum* Stämmen GB4 (bei 120 %), Dd2 (bei 100 %) und Ecu1110 (0 %) sind durch eine fette Umrandung gekennzeichnet.

Die Graphik (Abbildung 3.19.) soll in erster Linie einen Überblick darüber geben, in welche Richtung die einzelnen Mutationen die Aktivität verändern. Allerdings ist hier zu beachten, dass durch die eingeführten Mutationen die Expressionseffizienz verändert werden kann, was ebenfalls zu Aktivitätsunterschieden der einzelnen Varianten führen kann. In manchen Fällen bewirken Mutationen eine verhältnismäßig geringfügige Veränderung (von 10 % auf 30 % oder von 120 % auf 100 %). Es gibt aber auch Mutationen, welche Unterschiede von mehr als 100 % bewirken und somit einen erheblichen Einfluss auf die Transportaktivität des Transporters hat. Die prozentualen Werte für die Aktivität sind gerundet.

3.5. Nachweis der Expression von PfCRT in Oozyten

In Abschnitt 3.1. wurde am Beispiel von CQ gezeigt, dass die Akkumulation von selbigem auf den PfCRT vermittelten Transport zurückzuführen ist. Zunächst wurde mit Oozyten von *X. laevis* die Aufnahme von CQ, QN und QD gemessen, um das Expressionssystem als solches und die eigene Handhabung des Systems zu validieren (Abbildung 3.2. A). Anschließend wurde die Expression mittels Western Blot qualitativ nachgewiesen (Abbildung 3.2. B) und Inhibierungsversuche mit VP durchgeführt (Abbildung 3.3.). Die Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme von CQ durch PfCRT vermittelt wird. Wie aber verhält es sich für andere PfCRT Varianten? Um zu zeigen, dass auch diese exprimiert wurden – vor allem diejenigen, bei welchen keine Aufnahme zu sehen war – wurde hierfür ebenfalls die Expression mittels Western Blot qualitativ nachgewiesen. Dazu wurden Oozytenlysate wie in Abschnitt 2.2.3.1. beschrieben hergestellt. Es wurden die jeweilige PfCRT Variante exprimierende Oozyten und Kontrolloozyten (mit H₂O injizierte Negativkontrollen) verwendet. Von den Lysaten wurden jeweils 10 µL für die SDS-PAGE aufgetragen und anschließend auf eine PVDF Membran transferiert. Die Detektion der Proteine wurde mittels anti-PfCRT Antikörper durchgeführt. Die Expression einer Auswahl von PfCRT Varianten, sowohl von solchen, welche Substratakkumulation vermitteln, als auch von Varianten, die keine Akkumulation vermitteln ist in Abbildung 3.20. dargestellt. Zur Kontrolle des Ladevolumens wurden dieselben Membranen, worauf die jeweiligen PfCRT Varianten nachgewiesen worden waren, vom dafür verwendeten anti-PfCRT Antikörper befreit (Abschnitt 2.2.3.5.) und im Anschluss darauf mit einem anti-Tubulin Antikörper behandelt. So kann das Expressionsvolumen des jeweils nachzuweisenden Proteins abgeschätzt werden. Dennoch ist dies kein verlässlicher quantitativer Nachweis, da die Signalintensität für dasselbe Protein innerhalb verschiedener Western Blots in Relation zum Tubulin-Signal zu sehr variierte. Es bleibt ein qualitativer Nachweis, welcher zeigt, dass das Protein überhaupt exprimiert wird. Somit bleibt eine verlässliche Korrelation der Expressionsdichte mit der Transportaktivität der jeweiligen PfCRT Variante aus. Eine Normalisierung zum Ausgleich von eventuellen quantitativen Unregelmäßigkeiten in der membranständigen Expression der verschiedenen PfCRT Varianten wurde aber für die PfCRT Dd2^{T76X} Varianten vorgenommen, indem die jeweiligen Werte für die Substrataufnahme auch als Quotient des einen Substrates gegen das jeweils andere aufgezeigt wurden (Abbildung 3.10.).

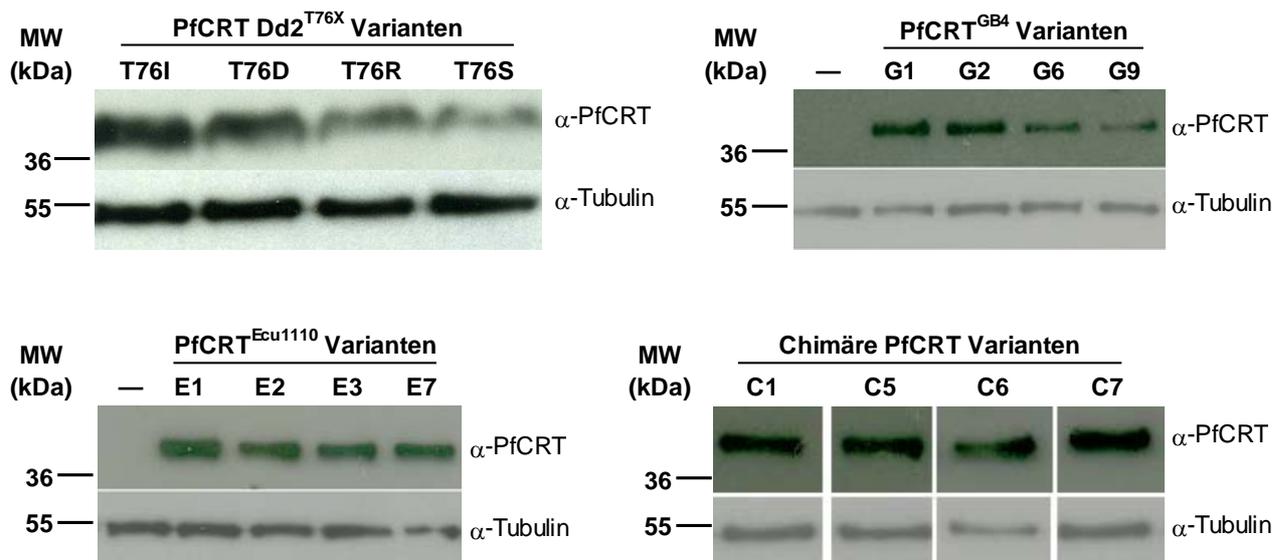


Abbildung 3.20.: Expression verschiedener PfCRT Varianten

Für die SDS-PAGE wurden je Oozytenlysat 10 μ L aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) transferiert und mit anti-PfCRT Antikörper behandelt. Zur Ladekontrolle wurde anti-Tubulin verwendet (— = Negativkontrolle).

PfCRT besitzt ein Molekulargewicht von 45 kDa. Auf der mit anti-PfCRT Antikörper behandelten Membran waren Banden erkennbar, welche alle zwischen der 36 kDa und 55 kDa Markierung liegen (Abbildung 3.20.). Da alle Banden auf derselben Höhe lagen und keine weiteren Banden zu sehen waren, kann die Expression der jeweiligen PfCRT Variante als nachgewiesen betrachtet werden. Die Kontrolloozyten zeigten nach der Behandlung mit anti-PfCRT Antikörper kein Signal.

Eine andere Bande war auf der jeweils selben Membran erkennbar, nachdem der anti-PfCRT Antikörper abgewaschen und die Membran mit einem anti-Tubulin Antikörper behandelt worden war. Diese Bande liegt bei 55 kDa (Abbildung 3.20.). Tubulin wird in Oozyten konstitutiv exprimiert und zeigt deshalb erwartungsgemäß auch ein Signal bei Kontrolloozyten. Auch hier waren die Signale sehr spezifisch.

4. Diskussion

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit zielte darauf ab, die Mechanismen zu verstehen, welche dem durch PfCRT vermittelten Transport der untersuchten Substrate zugrunde liegen. Die erste Frage, die hierbei angegangen wurde, zielte auf die Substratbindetaschen für CQ und QN in PfCRT^{Dd2} ab. Nachdem die Versuche dazu (Abbildung 3.4. – 3.8.) gezeigt haben, dass die Substrate an unterschiedliche Bindetaschen binden, widmete sich die Arbeit der genaueren Untersuchung derselben. Durch gezielte Mutagenese wurden verschiedene Varianten des Transporters generiert und die mit den Mutationen einhergehenden Veränderungen in der Transportaktivität geprüft. Zunächst wurde dies für die – wie in dieser Arbeit schon mehrmals erwähnt – wichtigen Aminosäureposition 76 durchgeführt, indem das an dieser Position in PfCRT^{Dd2} befindliche Threonin (T) sukzessive durch die 19 restlichen proteinogenen Aminosäuren ersetzt wurde und die daraus resultierenden Aktivitätsunterschiede analysiert wurden. Im Anschluss darauf wurde die Bedeutung der restlichen 7 Positionen, welche in PfCRT^{Dd2} im Vergleich zu PfCRT^{HB3} mutiert sind, ebenfalls durch gezielte Mutagenese untersucht. Auf diese Weise wurden für bestimmte Aminosäuren Rückschlüsse gezogen. Zum einen auf die Funktion dieser Aminosäuren für den Transport und zum anderen als Bestandteil der Substratbindetaschen und deren Interaktion mit den jeweiligen Substraten.

4.1. Bindemechanismus von PfCRT für CQ und QN

Die Analyse und Auswertung der Wettbewerbsversuche, in welchen die konzentrationsabhängige CQ Aufnahme in Anwesenheit von QN und umgekehrt auch die QN Aufnahme in Anwesenheit von CQ gemessen wurde deuten darauf hin, dass beide Substrate sich gegenseitig im Rahmen einer partiell gemischten Inhibierung bezüglich des Transportes durch PfCRT hemmen. Die Affinität des Substrates für den freien Transporter ist höher als die zum Transporter-Inhibitor-Komplex, wobei Inhibitor hierbei für das jeweils konkurrierende Substrat steht. Dies kommt dadurch zum Ausdruck, dass der jeweilige K_m -Wert mit zunehmender Konzentration des konkurrierenden Substrates hyperbolisch zunimmt (Abbildung 3.4. bzw. Abbildung 3.6.). Der Schnittpunkt im 3. Quadranten (unten links) in den entsprechenden Lineweaver-Burk Darstellungen (Abbildung 3.5. bzw. Abbildung 3.7.) deutet auf die zufällige und voneinander unabhängige Bindung der Substrate

CQ und QN an den unterschiedliche Bindetaschen im Transporter hin (Stein, 1986). Doch was sind die mechanistischen Grundlagen hierfür?

Die Interaktion zwischen den Substraten und PfCRT erscheint relativ komplex. Bei einer partiell (hyperbolisch) gemischten Inhibierung kann der Inhibitor sowohl an das freie Enzym als auch an das Enzym-Substrat-Komplex binden, hat jedoch, eine höhere Affinität für den einen oder anderen Zustand. Demnach kann dieser Inhibierungs-Mechanismus als eine Mischung aus **kompetetiver Inhibierung** (Inhibitor kann nur an freies Enzym binden) und **unkompetetiver Inhibierung** (Inhibitor kann nur an Enzym-Substrat-Komplex binden) angesehen werden (Baker *et al.*, 2007, Bisswanger, 2008). Außerdem behält der Enzym-Substrat-Komplex eine geringe katalytische Aktivität bei, so dass der Inhibitor selbst bei Sättigung die Aktivität des Enzyms nicht vollständig unterbinden kann. Diese für Enzyme geltenden kinetischen Gesetzmäßigkeiten werden hier auf den Transporter angewendet.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit lassen auf eine partiell gemischte Inhibierung schließen, wobei das eine Substrat (CQ bzw. QN) jeweils als Inhibitor des anderen Substrates (QN bzw. CQ) fungiert. Im allgemeinen Transportmechanismus einer partiell gemischten Inhibierung (Abbildung 4.1.) ist der Inhibitor tatsächlich ein Inhibitor, der vom Enzym nicht umgesetzt wird (Segel, 1993).

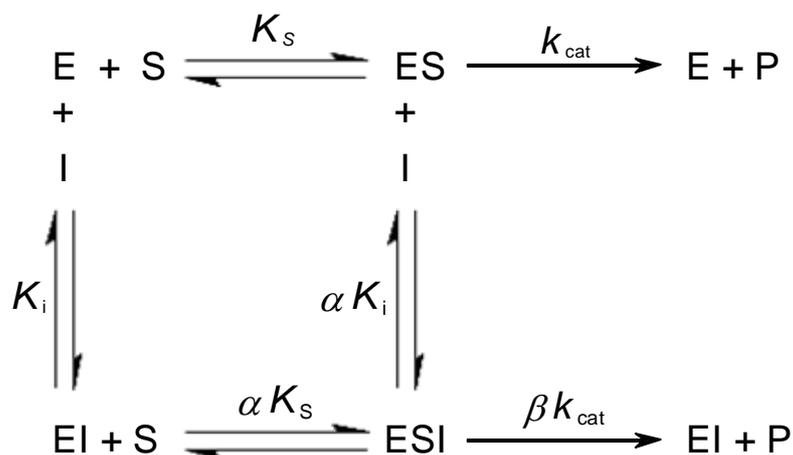


Abbildung 4.1.: Allgemeiner Mechanismus der partiell (hyperbolisch) gemischten Inhibierung

Die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} bestimmt die Umsetzung des Enzym-Substrat-Komplexes zu Enzym und Produkt. β ist der Faktor, um welchen die Umsetzungseffizienz durch die Bindung des Inhibitors herabgesetzt wird βk_{cat} . K_S bzw. K_i sind die Dissoziationskonstanten des Substrates bzw. Inhibitors, welche die Affinität für das Enzym beschreiben. α ist der Faktor, um welchen diese Konstanten verändert werden ($\alpha = 1 \rightarrow$ kein Einfluss auf Affinität, $\alpha < 1 \rightarrow$ Herabsetzung der Konstanten, d. h. Steigerung der Affinität, $\alpha > 1 \rightarrow$ Erhöhung der Konstanten, d. h. Herabsetzung der Affinität)

Im vorliegenden Fall jedoch gibt es einen entscheidenden Unterschied. Beide Substrate werden umgesetzt, d. h. in diesem Fall werden sowohl CQ als auch QN von der *cis*-Seite der Oozyte auf die *trans*-Seite, also vom Aufnahmepuffer ins in die Oozyte transportiert. Es gibt somit keinen tatsächlichen Inhibitor, welcher nur als solcher wirkt. Wie schon erwähnt erfolgt die Bindung der beiden Substrate an den Transporter zufällig und unabhängig voneinander, worauf die jeweilige Lineweaver-Burke Darstellung hindeutet, in welcher sich die Geraden im dritten Quadranten (unten links) schneiden (Abbildung 3.5. A und 3.7. A) (Stein, 1986). Auch der hyperbolische Anstieg der Steigungen der Geraden (Abbildung 3.5. B und 3.7. B) ist ein klares Indiz für eine partiell gemischte Inhibierung (Baker *et al.*, 2007, Bisswanger, 2008). Da also beide Substrate unabhängig voneinander umgesetzt werden können, muss der hier geltende Transportmechanismus – basierend auf dem allgemeinen Mechanismus der partiell gemischten Inhibierung – angepasst werden (Abbildung 4.2.).

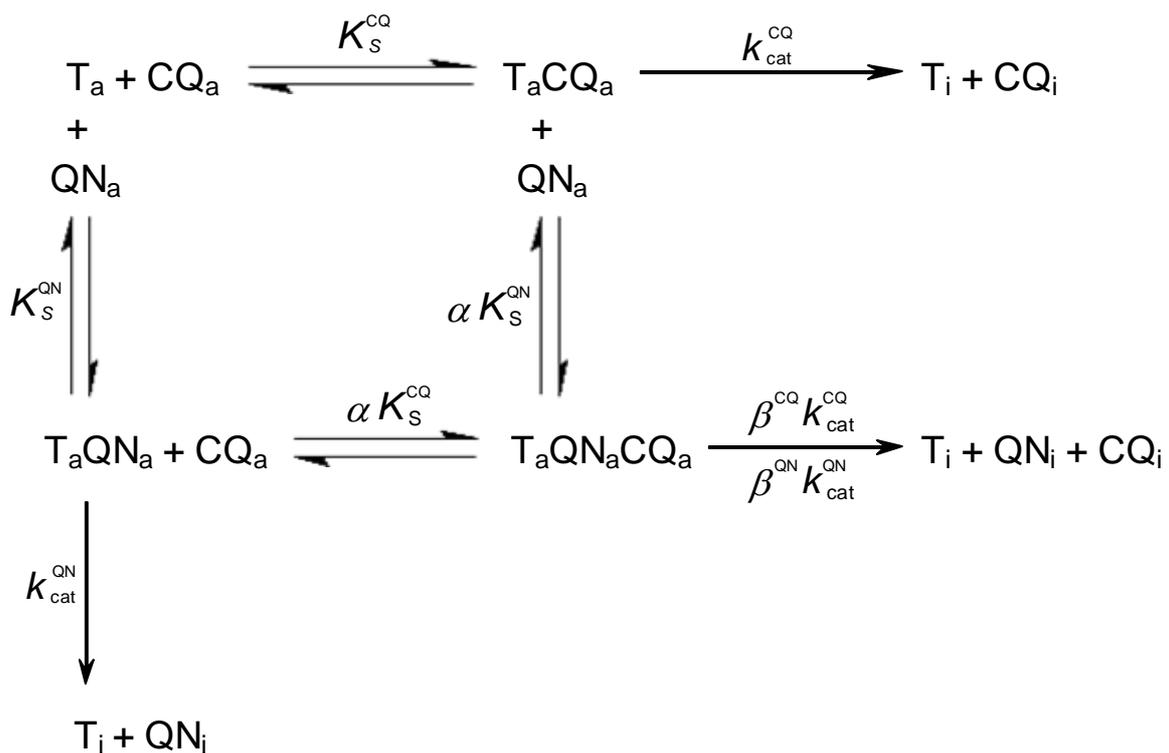


Abbildung 4.2.: Transportmechanismus für CQ und QN durch PfCRT basierend auf den allgemeinen Mechanismus der partiell gemischten Inhibierung

Der entscheidende Unterschied zum allgemeinen Mechanismus (Abbildung 4.1.) ist, dass hier beide Substrate umgesetzt werden (T = Transporter, also PfCRT, K_S = jeweilige Dissoziationskonstante für CQ bzw. QN, k_{cat} = jeweilige Geschwindigkeitskonstante für CQ bzw. QN, α = Dissoziationskonstanten beeinflussender Faktor, β = Geschwindigkeitskonstanten beeinflussender Faktor, tiefgestelltes a = außen, d. h. außerhalb der Oozyte, tiefgestelltes i = innen, d. h. innerhalb der Oozyte). Da k_{cat} für CQ und QN unterschiedlich sind und der Komplex T QN CQ zu T + QN + CQ umgesetzt wird, resultieren daraus zwei unterschiedliche β -Werte.

Prinzipiell ist der angepasste Transportmechanismus (Abbildung 4.2.) der gleiche wie der allgemeine Mechanismus der partiell gemischten Inhibierung (Abbildung 4.1.). Jedoch zieht die Umsetzung beider Substrate unterschiedliche k_{cat} für CQ und QN nach sich. Da nun der Transporter-QN-CQ Komplexes aus zwei verschiedenen Richtungen zustande kommt (Transporter-QN Komplex bindet CQ oder Transporter-CQ Komplex bindet QN), hat dies zur Folge, dass bei der Umsetzung des Transporter-QN-CQ Komplexes zwei unterschiedliche β -Werte resultieren (Abbildung 4.2.), so dass der βk_{cat} für beide Fälle gleich ist. Alle kinetischen Parameter wurden empirisch oder durch SigmaPlot 11.0[®] bzw. SigmaPlot 12[®] ermittelt. Die empirisch ermittelten Werte konnten außerdem durch SigmaPlot 11.0[®] bzw. SigmaPlot 12[®] gestützt werden. Tabelle 4.1. listet alle Parameter auf, wobei zu beachten ist, dass der k_{cat} -Wert der Quotient aus V_{max} und der Konzentration des Transporter-Substrat-Komplexes ($[TS]$) ist ($k_{cat} = (V_{max}/[TS])$). Wenn das Substrat saturiert ist, wie es bei der Ermittlung der Michaelis-Menten Kurven der Fall war (Abbildung 3.4. und Abbildung 3.6.), ist jedes PfCRT Molekül mit Substrat gebunden, liegt also als Transporter-Substrat-Komplex vor. Aus diesem Grund kann $[TS]$ für beide Richtungen (CQ als Substrat und QN als konkurrierendes Substrat und umgekehrt) als gleich angenommen werden kann. Da $[TS]$ jedoch nicht experimentell determiniert werden konnte, kann dieser Wert vernachlässigt werden, ohne die Interpretation der Ergebnisse grundsätzlich zu beeinflussen.

Tabelle 4.1.: Kinetische Parameter des Transportmechanismus von PfCRT (Abbildung 4.2.)

Die Parameter wurden empirisch oder mathematisch durch SigmaPlot 11.0[®] bzw. SigmaPlot 12[®] ermittelt. Die empirisch ermittelten Werte konnten auch durch SigmaPlot 11.0[®] bzw. SigmaPlot 12[®] gestützt werden. Die Berechnung der einzelnen Parameter erfolgte auf der Grundlage der Gleichung für die partiell gemischte Inhibierung (siehe Abschnitt 3.2.2., Seite 65)

Parameter	Wert	
	CQ	QN
K_S (μM)	$187,05 \pm 25,32$	$21,92 \pm 3,52$
K_i (μM)	$20,00 \pm 4,04$	$265,78 \pm 74,57$
V_{max} (pmol/Oozyte/h)	$34,36 \pm 1,88$	$9,22 \pm 0,55$
α	$3,87 \pm 1,95$	$3,28 \pm 1,66$
β	$0,10 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,11$
αK_S (μM)	$724,72 \pm 378,09$	$71,82 \pm 38,11$
βV_{max} (pmol/Oozyte/h)	$3,27 \pm 1,85$	$3,27 \pm 0,99$

Der Konzentrationsanstieg des jeweils konkurrierenden Substrates setzt die Transporteffizienz des Transporters für das eigentliche Substrat bis auf den Grenzwert βV_{max} herab, behält also

selbst bei Saturierung mit dem konkurrierenden Substrat eine restliche Minimalaktivität bei. Da α die K_S -Werte aus verschiedenen Richtungen hin zum selben Transporter-QN-CQ Komplex beeinflusst, hat es sinnigerweise für beide Richtungen den gleichen Wert. Für β müssen, wie oben schon bemerkt, zwei unterschiedliche Werte resultieren, da diese mit dem jeweils entsprechenden V_{\max} -Wert mutipliziert den gleichen Wert ergeben müssen (Tabelle 4.1.), da die Reaktion aus einer Richtung kommt und in eine Richtung geht, d. h. ein Transporter-QN-CQ Komplex wird in freien Transporter + QN + CQ umgesetzt (Abbildung 4.2.). Die auf Grundlage der Gleichung für die partiell gemischte Inhibierung (siehe Abschnitt 3.2.2., Seite 65) errechneten Werte (Tabelle 4.1.) stimmen mit den aus den entsprechenden Schaubildern (Abbildung 3.4. und 3.6.) überein, was den postulierten Inhibierungs-Typ untermauert. Des Weiteren sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass die K_S - und die K_I -Werte über Kreuz übereinstimmen, d. h. der K_S -Wert von CQ entspricht logischerweise dem K_I -Wert von QN und umgekehrt, da die beiden Substrate gegenseitig als Inhibitor agieren.

Alle diese Beobachtungen zeigen, dass PfCRT^{Dd2} den Transport beider Substrate vermitteln kann und deuten mit den aufgezeigten kinetischen Parametern (Tabelle 4.1.) einer partiell gemischten Inhibierung (Abbildungen 3.4. – 3.8., 4.1. und 4.2.) auf ein Transportsystem mit unterschiedlichen Bindedomänen für CQ und QN hin. Durch Bindung des jeweils konkurrierenden Substrates wird die Affinität für das eigentliche Substrat herabgesetzt, wahrscheinlich durch einen allosterischen Effekt.

Die im Rahmen dieser Arbeit systematisch durchgeführte Mutagenese an PfCRT, bei welcher der Focus zunächst auf der wichtigen Aminosäure 76 lag und anschließend die restlichen sieben schon erwähnten Positionen untersucht wurden, konnte einen Einblick in die Beschaffenheit dieser Bindedomänen liefern.

4.2. Bedeutung der mutierten Aminosäuren für Bindung und Transport der Substrate

4.2.1. Bedeutung der Aminosäure 76

Nachdem PfCRT als Hauptdeterminante der CQ-Resistenz identifiziert worden war (Fidock *et al.*, 2000), sind eine Vielzahl von Untersuchungen an diesem Protein durchgeführt worden. Diese Untersuchungen haben unter Anderem zutage gebracht, dass verschiedene Mutationen

im Protein eine Rolle für die CQ-Resistenz spielen (Fidock *et al.*, 2000). Vor allem der Aminosäure an Position 76 kommt hierbei eine entscheidende Rolle zu (Lakshmanan *et al.*, 2005).

In natürlich vorkommenden *P. falciparum* Stämmen ist das in CQ sensitiven Stämmen an Position 76 befindliche Lysin (K76) in den meisten Fällen durch ein Threonin ersetzt (K76T) (Chen *et al.*, 2003, Mita *et al.*, 2003). Es gibt aber natürlich vorkommende resistente Stämme, bei welchen jeweils die Mutationen K76N (in Indonesien) (Huaman *et al.*, 2004) oder K76A (in Thailand) (Chaijaroenkul *et al.*, 2011) vorkommt. Außerdem wurden in den Parasitenstamm 106/1 unter Selektionsdruck durch CQ die Mutationen K76N und K76I eingeführt, welche 8- bis 12-fach höhere CQ IC₅₀-Werte bewirkten und somit auf dem Niveau der CQ resistenten Linie FCB waren (Cooper *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen festigen den Verdacht, dass aus Substitutionen von K76 durch ungeladene Aminosäuren eine CQ-Resistenz in Parasiten resultiert (Chaijaroenkul *et al.*, 2011, Cooper *et al.*, 2002). Außerdem hat dies zu den mit *X. laevis* Oozyten durchgeführten Versuchen in dieser Arbeit inspiriert, worin das T76 in PfCRT^{Dd2} sukzessive durch die restlichen 19 proteinogenen Aminosäuren ersetzt wurde (T76X) und die damit einhergehende Akkumulation von CQ und außerdem QN und QD gemessen wurde.

In diesem Versuchsansatz konnte T76 durch fast jede andere Aminosäure ersetzt werden, ohne seine Transportfähigkeit für CQ, QN und QD einzubüßen. Lediglich die Substitution durch eine positiv geladene Aminosäure (Histidin (H), Arginin (R) oder Lysin (K)) brachte die durch die entsprechende PfCRT Variante vermittelte Substrataufnahme auf das Niveau von PfCRT^{HB3}, der Variante des CQ sensitiven Stammes. Dies bestätigt den Verdacht, dass die positive Ladung an Position 76 den Transport der protonierten und damit positiv geladenen Substrate unterbindet. Wahrscheinlich bindet das Substrat aufgrund der Abstoßungskräfte nicht an den Transporter, was eine Interaktion zwischen Substrat und Transporter unmöglich macht. Zusammen mit der Identifizierung von PfCRT als Hauptdeterminante der CQ-Resistenz (Fidock *et al.*, 2000), untermauern diese Daten die Vermutung, dass der Verlust der positiven Ladung eine zentrale Rolle für die CQ-Resistenz spielt. Es konnte auch für Transporter in anderen eukaryotischen Organismen nachgewiesen werden, dass durch Mutationen bewirkte Ladungsveränderungen innerhalb oder in der Nähe einer Transmembrandomäne großen Einfluss auf die Eigenschaften des jeweiligen Transporters haben (Egner *et al.*, 2000, Pajor *et al.*, 2000). Allerdings reicht die Mutation K76T allein nicht aus, um den Transport von CQ zu vermitteln (Dave, 2011, Lakshmanan *et al.*, 2005). Der Austausch durch Prolin (P) setzt ebenfalls die Transportfähigkeit von PfCRT

für CQ, QN und QD außer Kraft. In diesem Fall ist es aber wahrscheinlicher, dass die cyclische Form der Seitenkette des Prolins (\rightarrow „Helixbrecher“) dafür verantwortlich ist, wodurch eine unkorrekte Faltung des Proteins erreicht wird und schwerwiegende Folgen für die Funktionalität von PfCRT nach sich zieht.

In einer Studie von Cooper und Kollegen konnte beobachtet werden, dass die Mutation K76I innerhalb der Parasitenlinie 106/1 die Sensitivität für QN erhöhte und gleichzeitig die für QD herabsetzte, was auf einen stereospezifischer Effekt hindeutet (Cooper *et al.*, 2002). Analog dazu dürfte durch PfCRT Dd2^{T76I} in Oozyten keine QN Akkumulation vermittelt werden, sondern nur für dessen Enantiomer QD. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen jedoch im Vergleich zur Kontrolle PfCRT^{HB3} eine signifikant höhere Akkumulation für beide Substrate (Abbildung 3.9.). Der entscheidende Unterschied zwischen den von Cooper und Kollegen und den in dieser Arbeit durchgeführten Studien allerdings ist, dass das in Oozyten exprimierte Protein isoliert untersucht werden kann. In Untersuchungen innerhalb von Zellkulturen ist aber eine Vielzahl von Faktoren nicht kalkulierbar. Womöglich hat K76I Auswirkungen auf die Interaktion von PfCRT mit anderen Faktoren im Parasiten, was zu dem oben genannten stereospezifischen Effekt führt. Es konnte aber für die Mutationen T76N und T76C ein solcher stereospezifischer Effekt beobachtet werden, wobei in beiden Fällen eine signifikant höhere Akkumulation von QN vermittelt wurde (Abbildung 3.10.). Asparagin (N) und Cystein (C) sind beide ungeladen, polar und aliphatisch und auch bezüglich ihrer Masse sind sie nicht sehr unterschiedlich. Der einzige grundlegende Unterschied liegt in deren Hydrophobizitätsindex (-3,5 für Asparagin und 2,5 für Cystein \rightarrow je hydrophober die Aminosäure, desto höher der Wert), wobei Cystein hydrophober ist als Asparagin (Kyte & Doolittle, 1982). Worin genau aber die biochemischen und molekularen Hintergründe dafür liegen, bleibt in dieser Arbeit ungeklärt.

Weitere Einblicke in die Bedeutung der Position 76 lieferten Untersuchungen zur Transportkinetik von PfCRT Dd2^{T76X}. Dabei wurde T76 durch die Aminosäuren Isoleucin (I, unpolar), Asparaginsäure (D, negativ geladen), Serin (S) und Asparagin (N) (beide ungeladen polar) und Tryptophan (W, unpolar aromatisch) ausgetauscht und somit ein weites Spektrum an Aminosäure-Charakteristika abgedeckt. Die mit der jeweiligen T76X Mutation einhergehenden Veränderungen der kinetischen Parameter wurden innerhalb konzentrationsabhängiger Aufnahmestudien beobachtet. Es konnte kein Unterschied in den entsprechenden K_m -Werten festgestellt werden (Abbildung 3.11. und 3.12.), diese Position wirkt sich also nicht auf die Affinität des Transporters für CQ aus. Die Transporteffizienz

hingegen wurde durch T76X in mehr oder weniger starkem Ausmaß beeinflusst, was durch die Veränderungen in den V_{\max} -Werten zum Ausdruck kommt (Abbildung 3.11.).

Die Beobachtungen, dass T76 durch fast alle anderen Aminosäuren ersetzt werden kann, ohne die Aktivität des Transporters grundsätzlich zu beeinträchtigen und dessen Affinität für CQ zu beeinflussen, deuten gemeinsam darauf hin, dass diese Position nicht Teil der Substratbindetasche ist. Vielmehr scheint der Sinn der in den meisten resistenten Stämmen vorkommenden Substitution K76T darin zu liegen, die positive Ladung zu entfernen, welche andernfalls durch elektrostatische Abstoßung das Eintreten von positiv geladenen Substraten in die Bindetasche verhindern würde.

Warum konnte aber in der Natur bisher in den meisten Fällen nur K76T (Chen *et al.*, 2003, Mita *et al.*, 2003) und vereinzelt auch K76N (Huaman *et al.*, 2004) und K76A (Chaijaroenkul *et al.*, 2011) beobachtet werden und in Laborstämmen unter Selektionsdruck durch CQ K76N und K76I eingeführt werden (Cooper *et al.*, 2002)? Der Grund hierfür kann zum einen die Wahrscheinlichkeit sein, denn nur für die Substitutionen durch Glutaminsäure (E), Glutamin (Q), Asparagin (N), Threonin (T) und Isoleucin (I) reicht nur eine Punktmutation aus, um aus K76 (Codon AAA in PfCRT^{HB3}) die entsprechende Substitution zu generieren. Es kommt aber auch Alanin (K76A) in der Natur vor (Chaijaroenkul *et al.*, 2011), wofür zwei Punktmutationen notwendig sind. Im Gegensatz dazu konnten aber diverse, durch nur eine Punktmutation bewirkte Substitutionen noch nicht in der Natur beobachtet werden. Auch unter Laborbedingungen konnte K76 in Parasiten nicht durch jede beliebige Aminosäure ersetzt werden (Cooper *et al.*, 2002). Dies legt eine zweite Begründung für das Vorkommen von nur einigen Substitutionen nahe. Verschiedene Aminosäuren an Position 76 wirken sich wahrscheinlich unterschiedlich auf die physiologischen Eigenschaften von PfCRT aus und damit wahrscheinlich auch auf Überlebensfähigkeit der Parasiten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Aminosäure 76 offensichtlich nicht Teil der Substratbindetasche ist aber eine entscheidende Rolle für den Eintritt des positiv geladenen Substrates in selbige spielt.

4.2.2. Bedeutung der übrigen sieben mutierten Aminosäuren

Außer der Mutation K76T beinhaltet PfCRT^{Dd2} noch weitere sieben Mutationen im Vergleich zur Variante des Wildtyps PfCRT^{HB3}: M74I, N75E, A220S, Q271E, N326S, I356T und R371I. Welche Bedeutung jede einzelne dieser Mutationen allein oder in verschiedenen Kombinationen miteinander für Bindung und Transport der Substrate hat, soll im Folgenden diskutiert werden.

Das Einfügen von nur zwei bestimmten Mutationen, N75E und K76T, reicht schon aus, um eine statistisch signifikante PfCRT vermittelte Akkumulation der Substrate CQ, QN und QD zu erreichen (Abbildung 3.13., G13). Die Mutation K76T allein reicht nicht aus (Dave, 2011). Umgekehrt ist der Transporter ebenfalls inaktiv, wenn er alle PfCRT^{Dd2}-Mutationen außer T76 beibehält (Abbildung 3.9.). Für Aminosäure 75 ist der Sachverhalt jedoch etwas differenzierter. Im Falle von PfCRT^{Ecu1110} ist an dieser Position ein N (N76, wie im Wildtyp HB3), der dadurch vermittelte CQ Transport ist aber nicht vollständig unterbunden, sondern auf ~40 % von PfCRT^{Dd2} herabgesetzt. Für den Transport der Substrate QN und QD ist diese Variante jedoch inaktiv (Abbildung 3.15. und 3.16.). Ersetzt man in PfCRT^{Ecu1110} das N75 durch ein E (N75E), steigt die Akkumulation von QN auf über 25 % und die von QD auf knapp 50 % an (Abbildung 3.16., C3). E75 scheint also eine entscheidende Rolle für den Transport von QN/QD zu spielen. Ob Aminosäure 75 Teil der Bindetasche für QN/QD ist lässt sich allerdings aus diesen Beobachtungen nicht voraussagen. Die Aktivität bzw. Inaktivierung des Transporters für diese Substrate könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass mit der jeweils eingeführten Aminosäure Konformationsänderungen einhergehen, wodurch das Substrat daran gehindert wird, an seine Bindedomäne zu gelangen. Tauscht man in diesem Kontext N75 durch ein D aus (Abbildung 3.16., C5; D ist wie E negativ geladen und sauer), erreicht die Akkumulation aller drei Substrate das Niveau von C3 (Abbildung 3.16.). Der Austausch von N75 durch R (positiv geladen; Abbildung 3.16., C5) oder G (Aminosäure mit kleinster Seitengruppe; Abbildung 3.16., C7) inaktiviert den Transporter für alle drei Substrate. Augenscheinlich spielt die negative Ladung an dieser Stelle eine wichtige Rolle für die Aktivität des Transporters. Da aber auch das strukturell ähnliche CQ positiv geladen ist und N75 dessen Transport nicht unterbindet, lässt sich dies anhand dieser Beobachtungen nicht mit Sicherheit sagen.

Durch einen weiteren Kompetitionsversuch wurde Aminosäure 75 genauer unter die Lupe genommen. Hierbei wurde untersucht, ob PfCRT^{Ecu1110} nicht nur kein QN transportiert, sondern ob es überhaupt welches bindet. Diese Untersuchung hat gezeigt, dass es keine Interaktion zwischen der Ecu1110 Variante und QN gibt, was dadurch gezeigt worden ist, dass QN nicht den Transport von CQ inhibieren konnte (Abbildung 3.18.). Die Variante C2, für welche die Aktivität für QN und QD gezeigt worden ist (Abbildung 3.16.), wurde als Kontrolle im selben Ansatz getestet. Hier konnte sinnigerweise der Transport von CQ durch QN inhibiert werden (Abbildung 3.16.). Diese zusätzlichen Beobachtungen bestärken zwar die Vermutung, dass E75 mit den Substraten direkt interagiert, wahrscheinlich durch die Ionenbindung mit der positiv geladenen Aminogruppe im aromatischen Ring des Substrates,

dennoch bleibt ungeklärt, warum CQ durch PfCRT^{Ecu1110} transportiert wird, nicht aber QN. Eine mögliche Antwort könnte Aminosäure an Position 326 liefern. Einige in dieser Arbeit untersuchten PfCRT Varianten, welche an dieser Position ein D haben (Abbildung 3.15., E1, E4 und E6) aber kein E75, transportieren CQ aber weder QN noch QD. Es scheint also auch diese Position eine nicht unwichtige Rolle für die Selektivität und Aktivität zu spielen. Eigenartigerweise wird PfCRT^{Ecu1110}, bei welchem die Mutation M74I eingeführt worden ist (Abbildung 3.16., C4), auch für den Transport von CQ inaktiviert, obwohl die Einführung dieser Mutation in einem anderen Kontext keinerlei Auswirkung hat (Abbildung 3.13., GB4 und G1). Allerdings zeigt diese Mutation in einem weiteren Vergleich zwar keinen Unterschied für die Akkumulation von CQ, jedoch eine dramatische Veränderung der QN und QD Aufnahme (Abbildung 3.13., G5 und G9). Im Gesamtkontext betrachtet lässt sich folglich festhalten, dass die Kombination von verschiedenen Mutationen entscheidend für Aktivität und Selektivität des Transporters sein kann. Der enorme Anstieg der QN und QD Akkumulation durch die eben schon erwähnte Variante G9 (Abbildung 3.13.) ist auf die vier Rückmutationen I74M, S326N, T356I und I371R zurückzuführen. Möglicherweise bewirken diese vier Mutationen eine Faltung des Proteins, welche den Substraten QN und QD eine optimale Bindung an PfCRT ermöglichen und dadurch deren Akkumulation auf ~200 % der Dd2 Variante ansteigt. Allerdings muss noch berücksichtigt werden, dass bestimmte Mutationen bzw. Mutations-Kombinationen einen Einfluss auf die Expressionseffizienz der jeweiligen PfCRT Variante haben könnten, wodurch es zu den beobachteten Unterschieden in der Akkumulation könnte.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass es Mutationen von entscheidender Bedeutung gibt, welche allein über die Funktionalität des Transporters entscheiden können. Außerdem gibt es Mutationen, bei welchen die Kombination miteinander entscheidend sein kann. Es konnten teilweise Rückschlüsse auf die Bindetaschen für CQ und QN gezogen werden, welche jedoch durch weitere Studien bestätigt werden müssten. Doch welche Bedeutung haben die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse für das Gesamtverständnis und für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen Malaria.

4.3. Bedeutung dieser Arbeit für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria

PfCRT ist ein für den Parasiten essentielles Protein (Sanchez *et al.*, 2007b, Summers *et al.*, 2012) und stellt somit eine vielversprechende Zielstruktur für Malariatherapeutika dar. Außerdem ist es hauptsächlich für die CQ-Resistenz verantwortlich (Fidock *et al.*, 2000) und mit an der Vermittlung der Resistenz gegen QN beteiligt (Ferdig *et al.*, 2004). Weiterhin wird der PfCRT^{Dd2}-vermittelte CQ Transport durch eine Reihe von Wirkstoffen gegen Malaria inhibiert (Johnson *et al.*, 2004), was darauf hindeutet, dass diese auch durch PfCRT^{Dd2} transportiert werden. Im Fall von QN und QD konnte dies schon in einer vorangegangenen Arbeit nachgewiesen (Dave, 2011) und in dieser Arbeit bestätigt werden.

Versteht man die mechanistischen Grundlagen, welche dem Transport verschiedener Substrate durch PfCRT zugrunde liegen, könnte dies innovative Strategien in der Entwicklung neuer Wirkstoffe eröffnen. Auch das Verständnis um die molekularen Grundlagen zur Ausbildung von Resistenzen könnte eine Basis zur gezielten Entwicklung neuer Medikamente bilden.

Mutationen in PfCRT sind die Hauptursache für die Ausbildung der CQ-Resistenz und außerdem sind Veränderungen des Proteins mit einer erhöhten oder niedrigeren Anfälligkeit des Parasiten für eine Reihe von Malariatherapeutika assoziiert (Summers *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit durchgeführte Studie der Auswirkung von Mutationen auf die Aktivität von PfCRT konnte einige Hinweise auf die diesbezügliche Bedeutung bestimmter Aminosäuren liefern. Außerdem gewährt diese Arbeit einen Einblick in die mechanistische Wirkungsweise des transmembranen Transportproteins.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse liefern grundlegende Hinweise für die Arbeitsweise von PfCRT. Diese könnten für Programme hilfreich sein, die darauf abzielen, Substanzen zu entwickeln, welche das durch PfCRT vermittelte Ausschleusen von Anti-Malaria Wirkstoffen aus der Nahrungsvakuole heraus hemmen bzw. unterbinden.

5. Ausblick

Diese Arbeit hat einen Einblick in den Mechanismus geliefert, welchem der Substrattransport durch PfCRT zugrunde liegt. Es sind Hinweise, die durch die Auslegung der erzielten Ergebnisse gewonnen werden. Sowohl die Studie des Transportmechanismus durch gegenseitige Transporthemmung von CQ und QN als auch die Untersuchungen, welche auf der Mutagenese von PfCRT basieren, wurden in Anlehnung des aktuellen Standes der Wissenschaft erörtert und interpretiert.

Um einen tieferen Einblick in den Transportmechanismus von PfCRT zu erhalten, könnten weitere Kompetitionsversuche durchgeführt werden, beispielsweise mit einer Kombination von Substraten, wovon eines durch PfCRT transportiert wird (CQ, QN oder andere) und ein anderes, welches PfCRT nur blockiert wie z. B. VP. Das Transportverhalten von PfCRT könnte dann die Ergebnisse dieser Arbeit sowohl untermauern als auch ausbauen.

Die Suche nach dem natürlichen Substrat bzw. den natürlichen Substraten von PfCRT könnte weitere wertvolle Hinweise liefern, um zum Verständnis der Arbeitsweise beizutragen. Erste Untersuchungen hierzu sind schon durchgeführt worden, worin die PfCRT^{Dd2} vermittelte CQ Akkumulation durch eine Vielzahl von Substraten (Aminosäuren, Peptide und organische Kationen) gehemmt werden sollte (Martin *et al.*, 2009b). Eine umfassende Studie darüber, welche eindeutige Erkenntnisse liefert, steht jedoch noch aus.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit lassen nur Spekulationen über die in die Membran eingebettete dreidimensionale Struktur von PfCRT zu. Um endgültige Klarheit darüber zu schaffen, ist die Aufklärung der Kristallstruktur unerlässlich. Dies gestaltet sich aber für Transmembranproteine aufgrund ihrer amphipathischen Beschaffenheit recht schwierig. Sie besitzen eine in die Membran eingebettete hydrophobe Oberfläche und eine polare Oberfläche, welche in Kontakt mit der wässrigen Lösung auf beiden Seiten der Membran steht (Ostermeier & Michel, 1997). Dies macht die Handhabung von Membranproteinen problematisch.

Es sind also noch umfangreiche Studien notwendig, um die molekularen Grundlagen der Ausbildung von Resistenzen vollständig zu verstehen und die Mechanismen zu begreifen, welche dem Transport durch PfCRT zugrunde liegen.

6. Referenzen

- AcaClone-software, <http://www.acaclone.com> (letzter Zugriff: 08.04.2013).
- Adisa, A., M. Rug, M. Foley & L. Tilley, (2002) Characterisation of a delta-COP homologue in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **123**: 11-21.
- Agnandji, S. T., B. Lell, J. F. Fernandes, B. P. Abossolo, B. G. Methogo, A. L. Kabwende, A. A. Adegnika, B. Mordmuller, S. Issifou, P. G. Kremsner, J. Sacarlal, P. Aide, M. Lanaspá, J. J. Aponte, S. Machevo, S. Acacio, H. Bulo, B. Sigauque, E. Macete, P. Alonso, S. Abdulla, N. Salim, R. Minja, M. Mpina, S. Ahmed, A. M. Ali, A. T. Mtoro, A. S. Hamad, P. Mutani, M. Tanner, H. Tinto, U. D'Alessandro, H. Sorgho, I. Valea, B. Bihoun, I. Guiraud, B. Kabore, O. Sombie, R. T. Guiguemde, J. B. Ouedraogo, M. J. Hamel, S. Kariuki, M. Oneko, C. Odero, K. Otieno, N. Awino, M. McMorrow, V. Muturi-Kioi, K. F. Laserson, L. Slutsker, W. Otieno, L. Otieno, N. Otsyula, S. Gondi, A. Otieno, V. Owira, E. Oguk, G. Odongo, J. B. Woods, B. Ogutu, P. Njuguna, R. Chilengi, P. Akoo, C. Kerubo, C. Maingi, T. Lang, A. Olotu, P. Bejon, K. Marsh, G. Mwambingu, S. Owusu-Agyei, K. P. Asante, K. Osei-Kwakye, O. Boahen, D. Dosoo, I. Asante, G. Adjei, E. Kwara, D. Chandramohan, B. Greenwood, J. Lusingu, S. Gesase, A. Malabeja, O. Abdul, C. Mahende, E. Liheluka, L. Malle, M. Lemnge, T. G. Theander, C. Drakeley, D. Ansong, T. Agbenyega, S. Adjei, H. O. Boateng, T. Rettig, J. Bawa, J. Sylverken, D. Sambian, A. Sarfo, A. Agyekum, et al., (2012) A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* **367**: 2284-2295.
- Agnandji, S. T., B. Lell, S. S. Soulanoudjingar, J. F. Fernandes, B. P. Abossolo, C. Conzelmann, B. G. Methogo, Y. Doucka, A. Flamen, B. Mordmuller, S. Issifou, P. G. Kremsner, J. Sacarlal, P. Aide, M. Lanaspá, J. J. Aponte, A. Nhamuave, D. Quelhas, Q. Bassat, S. Mandjate, E. Macete, P. Alonso, S. Abdulla, N. Salim, O. Juma, M. Shomari, K. Shubis, F. Machera, A. S. Hamad, R. Minja, A. Mtoro, A. Sykes, S. Ahmed, A. M. Urassa, A. M. Ali, G. Mwangoka, M. Tanner, H. Tinto, U. D'Alessandro, H. Sorgho, I. Valea, M. C. Tahita, W. Kabore, S. Ouedraogo, Y. Sandrine, R. T. Guiguemde, J. B. Ouedraogo, M. J. Hamel, S. Kariuki, C. Odero, M. Oneko, K. Otieno, N. Awino, J. Omoto, J. Williamson, V. Muturi-Kioi, K. F. Laserson, L. Slutsker, W. Otieno, L. Otieno, O. Nekoye, S. Gondi, A. Otieno, B. Ogutu, R. Wasuna, V. Owira, D. Jones, A. A. Onyango, P. Njuguna, R. Chilengi, P. Akoo, C. Kerubo, J. Gitaka, C. Maingi, T. Lang, A. Olotu, B. Tsofa, P. Bejon, N. Peshu, K. Marsh, S. Owusu-Agyei, K. P. Asante, K. Osei-Kwakye, O. Boahen, S. Ayamba, K. Kayan, R. Owusu-Ofori, D. Dosoo, I. Asante, G. Adjei, G. Adjei, D. Chandramohan, B. Greenwood, J. Lusingu, S. Gesase, A. Malabeja, O. Abdul, H. Kilavo, C. Mahende, E. Liheluka, et al., (2011) First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* **365**: 1863-1875.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter, (2003) Molekularbiologie der Zelle *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA vierte Ausgabe*.
- AlKadi, H. O., (2007) Antimalarial drug toxicity: a review. *Chemotherapy* **53**: 385-391.
- Andrews, K. T. & M. Lanzer, (2002) Maternal malaria: *Plasmodium falciparum* sequestration in the placenta. *Parasitol Res* **88**: 715-723.
- Ashley, E. A. & N. J. White, (2005) Artemisinin-based combinations. *Curr Opin Infect Dis* **18**: 531-536.
- Ayong, L., G. Pagnotti, A. B. Tobon & D. Chakrabarti, (2007) Identification of *Plasmodium falciparum* family of SNAREs. *Mol Biochem Parasitol* **152**: 113-122.
- Baird, J. K., (2005) Effectiveness of antimalarial drugs. *N Engl J Med* **352**: 1565-1577.

- Baker, G., S. Dunn, A. Holt & A. Lajtha, (2007) Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Practical Neurochemistry Methods. *Springer*, **3rd edition**, .
- Barnwell, J. W., A. S. Asch, R. L. Nachman, M. Yamaya, M. Aikawa & P. Ingravallo, (1989) A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Clin Invest* **84**: 765-772.
- Baruch, D. I., B. L. Pasloske, H. B. Singh, X. Bi, X. C. Ma, M. Feldman, T. F. Taraschi & R. J. Howard, (1995) Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* **82**: 77-87.
- Baumeister, S., M. Winterberg, C. Duranton, S. M. Huber, F. Lang, K. Kirk & K. Lingelbach, (2006) Evidence for the involvement of Plasmodium falciparum proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. *Mol Microbiol* **60**: 493-504.
- Bellanca, S., (2008) Charakterisierung des putativen Aminosäuretransporters PFF1430c in Plasmodium falciparum. *Diplomarbeit*.
- Berendt, A. R., G. D. Tumer & C. I. Newbold, (1994) Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. *Parasitol Today* **10**: 412-414.
- Bhattacharjee, S., C. van Ooij, B. Balu, J. H. Adams & K. Haldar, (2008) Maurer's clefts of Plasmodium falciparum are secretory organelles that concentrate virulence protein reporters for delivery to the host erythrocyte. *Blood* **111**: 2418-2426.
- Bisswanger, H., (2008) Enzyme Kinetics - Principles and Methods *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*.
- Blisnick, T., M. E. Morales Betoulle, J. C. Barale, P. Uzureau, L. Berry, S. Desroses, H. Fujioka, D. Mattei & C. Braun Breton, (2000) Pfsbp1, a Maurer's cleft Plasmodium falciparum protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol Biochem Parasitol* **111**: 107-121.
- Boggild, A. K., M. E. Parise, L. S. Lewis & K. C. Kain, (2007) Atovaquone-proguanil: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis (II). *Am J Trop Med Hyg* **76**: 208-223.
- Bray, P. G., M. Mungthin, I. M. Hastings, G. A. Biagini, D. K. Saidu, V. Lakshmanan, D. J. Johnson, R. H. Hughes, P. A. Stocks, P. M. O'Neill, D. A. Fidock, D. C. Warhurst & S. A. Ward, (2006) PfCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX. *Mol Microbiol* **62**: 238-251.
- Brooks, A., O. J. Briet, D. Hardy, R. Steketee & T. A. Smith, (2012) Simulated impact of RTS,S/AS01 vaccination programs in the context of changing malaria transmission. *PLoS One* **7**: e32587.
- Brown, D. D., (2004) A tribute to the Xenopus laevis oocyte and egg. *J Biol Chem* **279**: 45291-45299.
- Caldarelli, S. A., M. Boisbrun, K. Alarcon, A. Hamze, M. Ouattara, X. Salom-Roig, M. Maynadier, S. Wein, S. Peyrottes, A. Pellet, M. Calas & H. Vial, (2010) Exploration of potential prodrug approach of the bis-thiazolium salts T3 and T4 for orally delivered antimalarials. *Bioorg Med Chem Lett* **20**: 3953-3956.
- Chaijaroenkul, W., S. A. Ward, M. Mungthin, D. Johnson, A. Owen, P. G. Bray & K. Nangchang, (2011) Sequence and gene expression of chloroquine resistance transporter (pfcrt) in the association of in vitro drugs resistance of Plasmodium falciparum. *Malar J* **10**: 42.
- Chen, N., D. E. Kyle, C. Pasay, E. V. Fowler, J. Baker, J. M. Peters & Q. Cheng, (2003) pfcrt Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant

- Plasmodium falciparum isolates from the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3500-3505.
- Chevli, R. & C. D. Fitch, (1982) The antimalarial drug mefloquine binds to membrane phospholipids. *Antimicrob Agents Chemother* **21**: 581-586.
- Chinappi, M., A. Via, P. Marcatili & A. Tramontano, (2010) On the mechanism of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum. *PLoS One* **5**: e14064.
- Chou, A. C. & C. D. Fitch, (1992) Heme polymerase: modulation by chloroquine treatment of a rodent malaria. *Life Sci* **51**: 2073-2078.
- Cooke, B. M., S. Morris-Jones, B. M. Greenwood & G. B. Nash, (1995) Mechanisms of cytoadhesion of flowing, parasitized red blood cells from Gambian children with falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* **53**: 29-35.
- Cooper, R. A., M. T. Ferdig, X. Z. Su, L. M. Ursos, J. Mu, T. Nomura, H. Fujioka, D. A. Fidock, P. D. Roepe & T. E. Wellems, (2002) Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in Plasmodium falciparum. *Mol Pharmacol* **61**: 35-42.
- Cooper, R. A., C. L. Hartwig & M. T. Ferdig, (2005) pfcrt is more than the Plasmodium falciparum chloroquine resistance gene: a functional and evolutionary perspective. *Acta Trop* **94**: 170-180.
- Cooper, R. A., K. D. Lane, B. Deng, J. Mu, J. J. Patel, T. E. Wellems, X. Su & M. T. Ferdig, (2007) Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. *Mol Microbiol* **63**: 270-282.
- Cortese, J. F., A. Caraballo, C. E. Contreras & C. V. Plowe, (2002) Origin and dissemination of Plasmodium falciparum drug-resistance mutations in South America. *J Infect Dis* **186**: 999-1006.
- Couffin, S., R. Hernandez-Rivas, T. Blisnick & D. Mattei, (1998) Characterisation of PfSec61, a Plasmodium falciparum homologue of a component of the translocation machinery at the endoplasmic reticulum membrane of eukaryotic cells. *Mol Biochem Parasitol* **92**: 89-98.
- Cowman, A. F., D. Berry & J. Baum, (2012) The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol* **198**: 961-971.
- Cowman, A. F. & B. S. Crabb, (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**: 755-766.
- Cox, F. E., (2010) History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors* **3**: 5.
- Craig, A. & A. Scherf, (2001) Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol* **115**: 129-143.
- Dahl, E. L., J. L. Shock, B. R. Shenai, J. Gut, J. L. DeRisi & P. J. Rosenthal, (2006) Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3124-3131.
- Dave, A., (2011) Characterisation of the drug transport properties of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter through expression in Xenopus laevis oocytes. *PhD thesis*.
- de Villiers, K. A., H. M. Marques & T. J. Egan, (2008) The crystal structure of halofantrine-ferriprotoporphyrin IX and the mechanism of action of arylmethanol antimalarials. *J Inorg Biochem* **102**: 1660-1667.

- Dondorp, A. M., S. Yeung, L. White, C. Nguon, N. P. Day, D. Socheat & L. von Seidlein, (2010) Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol* **8**: 272-280.
- Dubar, F., J. Khalife, J. Brocard, D. Dive & C. Biot, (2008) Ferroquine, an ingenious antimalarial drug: thoughts on the mechanism of action. *Molecules* **13**: 2900-2907.
- Dumont, J. N., (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* **136**: 153-179.
- Durand, R., S. Jafari, J. Vauzelle, J. F. Delabre, Z. Jesic & J. Le Bras, (2001) Analysis of pfcr1 point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **114**: 95-102.
- Dzekunov, S. M., L. M. Ursos & P. D. Roepe, (2000) Digestive vacuolar pH of intact intraerythrocytic *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine. *Mol Biochem Parasitol* **110**: 107-124.
- Eastman, R. T. & D. A. Fidock, (2009) Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 864-874.
- Eckstein-Ludwig, U., R. J. Webb, I. D. Van Goethem, J. M. East, A. G. Lee, M. Kimura, P. M. O'Neill, P. G. Bray, S. A. Ward, S. Krishna, C. P. Sanchez, A. Rotmann, W. D. Stein, M. Lanzer, S. G. Valderramos, D. Scanfeld, A. C. Uhlemann, D. A. Fidock, S. Krishna, K. J. Saliba, R. E. Martin, A. Broer, R. I. Henry, C. S. McCarthy, M. J. Downie, R. J. Allen, K. A. Mullin, G. I. McFadden, S. Broer & K. Kirk, (2003) Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*
- Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*
- Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance
- Sodium-dependent uptake of inorganic phosphate by the intracellular malaria parasite. *Nature* **424**: 957-961.
- Egner, R., B. E. Bauer & K. Kuchler, (2000) The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Mol Microbiol* **35**: 1255-1263.
- Ferdig, M. T., R. A. Cooper, J. Mu, B. Deng, D. A. Joy, X. Z. Su & T. E. Wellems, (2004) Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol* **52**: 985-997.
- Fidock, D. A., T. Nomura, A. K. Talley, R. A. Cooper, S. M. Dzekunov, M. T. Ferdig, L. M. Ursos, A. B. Sidhu, B. Naude, K. W. Deitsch, X. Z. Su, J. C. Wootton, P. D. Roepe & T. E. Wellems, (2000) Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* **6**: 861-871.
- Fischer, K., P. Horrocks, M. Preuss, J. Wiesner, S. Wunsch, A. A. Camargo & M. Lanzer, (1997) Expression of var genes located within polymorphic subtelomeric domains of *Plasmodium falciparum* chromosomes. *Mol Cell Biol* **17**: 3679-3686.
- Fitch, C. D., (2004) Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci* **74**: 1957-1972.
- Fitch, C. D., G. Z. Cai, Y. F. Chen & J. S. Ryerse, (2003) Relationship of chloroquine-induced redistribution of a neutral aminopeptidase to hemoglobin accumulation in malaria parasites. *Arch Biochem Biophys* **410**: 296-306.
- Fitch, C. D., G. Z. Cai & J. D. Shoemaker, (2000) A role for linoleic acid in erythrocytes infected with *Plasmodium berghei*. *Biochim Biophys Acta* **1535**: 45-49.
- Fitch, C. D. & N. V. Russell, (2006) Accelerated denaturation of hemoglobin and the antimalarial action of chloroquine. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2415-2419.

- Frevert, U., P. Sinnis, C. Cerami, W. Shreffler, B. Takacs & V. Nussenzweig, (1993) Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med* **177**: 1287-1298.
- Gallup, J. L. & J. D. Sachs, (2001) The economic burden of malaria. *Am J Trop Med Hyg* **64**: 85-96.
- Ginsburg, H., M. Krugliak, O. Eidelman & Z. I. Cabantchik, (1983) New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* **8**: 177-190.
- Gligorijevic, B., R. McAllister, J. S. Urbach & P. D. Roepe, (2006) Spinning disk confocal microscopy of live, intraerythrocytic malarial parasites. 1. Quantification of hemozoin development for drug sensitive versus resistant malaria. *Biochemistry* **45**: 12400-12410.
- Goldin, A. L., (1992) Maintenance of Xenopus laevis and oocyte injection. *Methods Enzymol* **207**: 266-279.
- Goldin, A. L. & K. Sumikawa, (1992) Preparation of RNA for injection into Xenopus oocytes. *Methods Enzymol* **207**: 279-297.
- Gould, G. W. & G. E. Lienhard, (1989) Expression of a functional glucose transporter in Xenopus oocytes. *Biochemistry* **28**: 9447-9452.
- Greenwood, B. M., K. Bojang, C. J. Whitty & G. A. Targett, (2005) Malaria. *Lancet* **365**: 1487-1498.
- Gurdon, J. B., C. D. Lane, H. R. Woodland & G. Marbaix, (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**: 177-182.
- Guttman, P. & P. Ehrlich, (1891) Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berliner Klinische Wochenschrift* **39**: 953-956.
- Hahn, A., (2009) Wunsch und Wirklichkeit - Vitamine zwischen Mangelvermeidung und Prävention. *Biologie in unserer Zeit*.
- Haldar, K. & N. Mohandas, (2007) Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Curr Opin Hematol* **14**: 203-209.
- Hayward, R., K. J. Saliba & K. Kirk, (2005) pfm-dr1 mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **55**: 1285-1295.
- Hayward, R., K. J. Saliba & K. Kirk, (2006) The pH of the digestive vacuole of Plasmodium falciparum is not associated with chloroquine resistance. *J Cell Sci* **119**: 1016-1025.
- Hediger, M. A., M. J. Coady, T. S. Ikeda & E. M. Wright, (1987a) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* **330**: 379-381.
- Hediger, M. A., T. Ikeda, M. Coady, C. B. Gundersen & E. M. Wright, (1987b) Expression of size-selected mRNA encoding the intestinal Na⁺/glucose cotransporter in Xenopus laevis oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 2634-2637.
- Hempelmann, E., I. Tesarowicz & B. J. Oleksyn, (2009) Kurzgefasste Geschichte der Malaria-Chemotherapie. *Pharmazie in unserer Zeit* **38**: 500-507.
- Henry, M., S. Alibert, E. Orlandi-Pradines, H. Bogreau, T. Fusai, C. Rogier, J. Barbe & B. Pradines, (2006) Chloroquine resistance reversal agents as promising antimalarial drugs. *Curr Drug Targets* **7**: 935-948.
- Hernandez-Rivas, R., D. Mattei, Y. Sterkers, D. S. Peterson, T. E. Wellems & A. Scherf, (1997) Expressed var genes are found in Plasmodium falciparum subtelomeric regions. *Mol Cell Biol* **17**: 604-611.
- Hill, D. R., J. K. Baird, M. E. Parise, L. S. Lewis, E. T. Ryan & A. J. Magill, (2006) Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am J Trop Med Hyg* **75**: 402-415.

- Hiller, N. L., S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estrano & K. Haldar, (2004) A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* **306**: 1934-1937.
- Huaman, M. C., K. Yoshinaga, A. Suryanatha, N. Suarsana & H. Kanbara, (2004) Short report: polymorphisms in the chloroquine resistance transporter gene in *Plasmodium falciparum* isolates from Lombok, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* **71**: 40-42.
- Hviid, L., (2005) Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta tropica* **95**: 270-275.
- Hviid, L., (2010) The role of *Plasmodium falciparum* variant surface antigens in protective immunity and vaccine development. *Hum Vaccin* **6**: 84-89.
- Hviid, L. & T. Staalsoe, (2004) Malaria immunity in infants: a special case of a general phenomenon? *Trends in parasitology* **20**: 66-72.
- Hyde, J. E., (2005) Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop* **94**: 191-206.
- Johnson, D. J., D. A. Fidock, M. Mungthin, V. Lakshmanan, A. B. Sidhu, P. G. Bray & S. A. Ward, (2004) Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Mol Cell* **15**: 867-877.
- Kashiwagi, K., A. Kashiwagi, A. Kurabayashi, H. Hanada, K. Nakajima, M. Okada, M. Takase & Y. Yaoita, (2010) *Xenopus tropicalis*: an ideal experimental animal in amphibia. *Exp Anim* **59**: 395-405.
- Kaviratne, M., S. M. Khan, W. Jarra & P. R. Preiser, (2002) Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Eukaryot Cell* **1**: 926-935.
- Khattab, A. & M. Q. Klinkert, (2006) Maurer's clefts-restricted localization, orientation and export of a *Plasmodium falciparum* RIFIN. *Traffic* **7**: 1654-1665.
- Kilejian, A., M. A. Rashid, M. Aikawa, T. Aji & Y. F. Yang, (1991a) Selective association of a fragment of the knob protein with spectrin, actin and the red cell membrane. *Mol Biochem Parasitol* **44**: 175-181.
- Kilejian, A., M. A. Rashid, M. Parra & Y. F. Yang, (1991b) Sequence of the knob protein of *Plasmodium falciparum* recognized by a monoclonal antibody. *Mol Biochem Parasitol* **48**: 231-233.
- Kirk, K., (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* **81**: 495-537.
- Kirk, K. & K. J. Saliba, (2007) Targeting nutrient uptake mechanisms in *Plasmodium*. *Curr Drug Targets* **8**: 75-88.
- Klayman, D. L., (1985) In reply: antimalarial etymology. *Science* **229**: 706-708.
- Krieg, P. A. & D. A. Melton, (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res* **12**: 7057-7070.
- Krishna, S., L. Bustamante, R. K. Haynes & H. M. Staines, (2008) Artemisinin: their growing importance in medicine. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 520-527.
- Krishna, S. & C. J. Woodrow, (1999) Expression of parasite transporters in *Xenopus* oocytes. *Novartis Found Symp* **226**: 126-139; discussion 139-144.
- Krishnamurthy, H., C. L. Piscitelli & E. Gouaux, (2009) Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature* **459**: 347-355.
- Krogstad, D. J., I. Y. Gluzman, B. L. Herwaldt, P. H. Schlesinger & T. E. Wellems, (1992) Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* **43**: 57-62.
- Krogstad, D. J., I. Y. Gluzman, D. E. Kyle, A. M. Oduola, S. K. Martin, W. K. Milhous & P. H. Schlesinger, (1987) Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science* **238**: 1283-1285.

- Kuhn, Y., P. Rohrbach & M. Lanzer, (2007) Quantitative pH measurements in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes using pHluorin. *Cell Microbiol* **9**: 1004-1013.
- Kuhn, Y., C. P. Sanchez, D. Ayoub, T. Saridaki, A. van Dorsselaer & M. Lanzer, (2010) Trafficking of the phosphoprotein PfCRT to the digestive vacuolar membrane in Plasmodium falciparum. *Traffic* **11**: 236-249.
- Kyte, J. & R. F. Doolittle, (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Lakshmanan, V., P. G. Bray, D. Verdier-Pinard, D. J. Johnson, P. Horrocks, R. A. Muhle, G. E. Alakpa, R. H. Hughes, S. A. Ward, D. J. Krogstad, A. B. Sidhu & D. A. Fidock, (2005) A critical role for PfCRT K76T in Plasmodium falciparum verapamil-reversible chloroquine resistance. *Embo J* **24**: 2294-2305.
- Lane, C. D., J. Champion, A. Colman, T. C. James & S. W. Applebaum, (1983) The fate of Xenopus and locust vitellogenins made in Xenopus oocytes. An export-import processing model. *Eur J Biochem* **130**: 529-535.
- Lanzer, M., H. Wickert, G. Krohne, L. Vincensini & C. Braun Breton, (2006) Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Int J Parasitol* **36**: 23-36.
- Laufer, M. K., S. Takala-Harrison, F. K. Dzinjalama, O. C. Stine, T. E. Taylor & C. V. Plowe, (2010) Return of chloroquine-susceptible falciparum malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites. *J Infect Dis* **202**: 801-808.
- Laufer, M. K., P. C. Thesing, N. D. Eddington, R. Masonga, F. K. Dzinjalama, S. L. Takala, T. E. Taylor & C. V. Plowe, (2006) Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N Engl J Med* **355**: 1959-1966.
- Leach, A., J. Vekemans, M. Lievens, O. Ofori-Anyinam, C. Cahill, S. Owusu-Agyei, S. Abdulla, E. Macete, P. Njuguna, B. Savarese, C. Loucq & W. R. Ballou, (2011) Design of a phase III multicenter trial to evaluate the efficacy of the RTS,S/AS01 malaria vaccine in children across diverse transmission settings in Africa. *Malar J* **10**: 224.
- Lehane, A. M. & K. Kirk, (2008) Chloroquine resistance-conferring mutations in pfCRT give rise to a chloroquine-associated H⁺ leak from the malaria parasite's digestive vacuole. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 4374-4380.
- Lehane, A. M. & K. Kirk, (2010) Efflux of a range of antimalarial drugs and 'chloroquine resistance reversers' from the digestive vacuole in malaria parasites with mutant PfCRT. *Mol Microbiol*.
- Lell, B. & P. G. Kremsner, (2002) Clindamycin as an antimalarial drug: review of clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2315-2320.
- Lindner, S. E., J. L. Miller & S. H. Kappe, (2012) Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cell Microbiol* **14**: 316-324.
- Lucius, R. & B. Loos-Frank, (1997) Parasitologie. Grundlagen für Biologen, Mediziner, Veterinärmediziner. . *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Marsh, K. & R. W. Snow, (1997) Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **352**: 1385-1394.
- Marti, M., R. T. Good, M. Rug, E. Knuepfer & A. F. Cowman, (2004) Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* **306**: 1930-1933.
- Martin, R. E., H. Ginsburg & K. Kirk, (2009a) Membrane transport proteins of the malaria parasite. *Mol Microbiol*.
- Martin, R. E. & K. Kirk, (2004) The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Mol Biol Evol* **21**: 1938-1949.

- Martin, R. E. & K. Kirk, (2007) Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood* **109**: 2217-2224.
- Martin, R. E., R. V. Marchetti, A. I. Cowan, S. M. Howitt, S. Broer & K. Kirk, (2009b) Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science* **325**: 1680-1682.
- Martin, S. K., A. M. Oduola & W. K. Milhous, (1987) Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* **235**: 899-901.
- Maughan, S. C., M. Pasternak, N. Cairns, G. Kiddle, T. Brach, R. Jarvis, F. Haas, J. Nieuwland, B. Lim, C. Muller, E. Salcedo-Sora, C. Kruse, M. Orsel, R. Hell, A. J. Miller, P. Bray, C. H. Foyer, J. A. Murray, A. J. Meyer & C. S. Cobbett, (2010) Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2331-2336.
- Mayer, S., (2009) Welche Vitaminpräparate empfehle ich der Schwangeren? Vitamine in der Schwangerschaft
Biologie in unserer Zeit.
- Mehlhorn, H. & G. Piekarski, (2002) Grundriss der Parasitenkunde. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.
- Mehlotra, R. K., H. Fujioka, P. D. Roepe, O. Janneh, L. M. Ursos, V. Jacobs-Lorena, D. T. McNamara, M. J. Bockarie, J. W. Kazura, D. E. Kyle, D. A. Fidock & P. A. Zimmerman, (2001) Evolution of a unique *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance phenotype in association with pfcr1 polymorphism in Papua New Guinea and South America. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12689-12694.
- Meierjohann, S., R. D. Walter & S. Muller, (2002) Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **368**: 761-768.
- Melton, D. A., P. A. Krieg, M. R. Rebagliati, T. Maniatis, K. Zinn & M. R. Green, (1984) Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* **12**: 7035-7056.
- Menard, R., (2005) Medicine: knockout malaria vaccine? *Nature* **433**: 113-114.
- Menendez, C., (1995) Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. *Parasitol Today* **11**: 178-183.
- Meshnick, S. R. D., M. J., (2001) The history of antimalarial drugs. In: Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery. pp. 15 - 25.
- Miller, A. J. & J. J. Zhou, (2000) *Xenopus* oocytes as an expression system for plant transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 343-358.
- Miller, L. H., D. I. Baruch, K. Marsh & O. K. Doumbo, (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**: 673-679.
- Mita, T., A. Kaneko, J. K. Lum, B. Bwijo, M. Takechi, I. L. Zungu, T. Tsukahara, K. Tanabe, T. Kobayakawa & A. Bjorkman, (2003) Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* **68**: 413-415.
- Mita, T., A. Kaneko, J. K. Lum, I. L. Zungu, T. Tsukahara, H. Eto, T. Kobayakawa, A. Bjorkman & K. Tanabe, (2004) Expansion of wild type allele rather than back mutation in pfcr1 explains the recent recovery of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Malawi. *Mol Biochem Parasitol* **135**: 159-163.

- Mota, M. M., G. Pradel, J. P. Vanderberg, J. C. Hafalla, U. Frevert, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig & A. Rodriguez, (2001) Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* **291**: 141-144.
- Mu, J., M. T. Ferdig, X. Feng, D. A. Joy, J. Duan, T. Furuya, G. Subramanian, L. Aravind, R. A. Cooper, J. C. Wootton, M. Xiong & X. Z. Su, (2003) Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol* **49**: 977-989.
- Neghina, R., A. M. Neghina, I. Marincu & I. Iacobiciu, (2010) Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. *Am J Med Sci* **340**: 492-498.
- Newbold, C., A. Craig, S. Kyes, A. Rowe, D. Fernandez-Reyes & T. Fagan, (1999) Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in Plasmodium falciparum. *Int J Parasitol* **29**: 927-937.
- Nzila, A., (2006) The past, present and future of antifolates in the treatment of Plasmodium falciparum infection. *J Antimicrob Chemother* **57**: 1043-1054.
- O'Neill, P. M., V. E. Barton & S. A. Ward, (2010) The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues. *Molecules* **15**: 1705-1721.
- Ockenhouse, C. F., C. Magowan & J. D. Chulay, (1989) Activation of monocytes and platelets by monoclonal antibodies or malaria-infected erythrocytes binding to the CD36 surface receptor in vitro. *J Clin Invest* **84**: 468-475.
- Okombo, J., E. Ohuma, S. Picot & A. Nzila, (2011) Update on genetic markers of quinine resistance in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **177**: 77-82.
- Olliaro, P., F. Castelli, S. Caligaris, P. Druilhe & G. Carosi, (1989) Ultrastructure of Plasmodium falciparum "in vitro". II. Morphological patterns of different quinolines effects. *Microbiologica* **12**: 15-28.
- Omari, A. A., C. Gamble & P. Garner, (2004) Artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria: a systematic review. *Trop Med Int Health* **9**: 192-199.
- Ostermeier, C. & H. Michel, (1997) Crystallization of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 697-701.
- Painter, H. J., J. M. Morrissey, M. W. Mather & A. B. Vaidya, (2007) Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage Plasmodium falciparum. *Nature* **446**: 88-91.
- Painter, H. J., J. M. Morrissey & A. B. Vaidya, (2010) Mitochondrial electron transport inhibition and viability of intraerythrocytic Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 5281-5287.
- Pajor, A. M., E. S. Kahn & R. Gangula, (2000) Role of cationic amino acids in the Na⁺/dicarboxylate co-transporter NaDC-1. *Biochem J* **350 Pt 3**: 677-683.
- Patel, S. N. & K. C. Kain, (2005) Atovaquone/proguanil for the prophylaxis and treatment of malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther* **3**: 849-861.
- Paul, R. T., A. P. McDonnell & C. B. Kelly, (2004) Folic acid: neurochemistry, metabolism and relationship to depression. *Hum Psychopharmacol* **19**: 477-488.
- Pei, X., X. An, X. Guo, M. Tarnawski, R. Coppel & N. Mohandas, (2005) Structural and functional studies of interaction between Plasmodium falciparum knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and erythrocyte spectrin. *J Biol Chem* **280**: 31166-31171.
- Piekarski, G., (1987) Medizinische Parasitologie. *Springer Verlag, Heidelberg*.
- Przyborski, J. M., S. K. Miller, J. M. Pfahler, P. P. Henrich, P. Rohrbach, B. S. Crabb & M. Lanzer, (2005) Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Embo J* **24**: 2306-2317.

- Ramharter, M., H. Noedl, K. Thimasarn, G. Wiedermann, G. Wernsdorfer & W. H. Wernsdorfer, (2002) In vitro activity of tafenoquine alone and in combination with artemisinin against *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **67**: 39-43.
- Ramya, T. N., S. Mishra, K. Karmodiya, N. Surolia & A. Surolia, (2007) Inhibitors of nonhousekeeping functions of the apicoplast defy delayed death in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 307-316.
- Reeder, J. C., A. N. Hodder, J. G. Beeson & G. V. Brown, (2000) Identification of glycosaminoglycan binding domains in *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 of a chondroitin sulfate A-adherent parasite. *Infect Immun* **68**: 3923-3926.
- Retief, F. & L. Cilliers, (2006) Periodic pyrexia and malaria in antiquity. *S Afr Med J* **96**: 684, 686-688.
- Robert-Koch-Institut, (2010) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010.
- Roberts, D. J., A. G. Craig, A. R. Berendt, R. Pinches, G. Nash, K. Marsh & C. I. Newbold, (1992) Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* **357**: 689-692.
- Roepe, P. D., (2009) Molecular and physiologic basis of quinoline drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Future Microbiol* **4**: 441-455.
- Rotmann, A., C. Sanchez, A. Guiguemde, P. Rohrbach, A. Dave, N. Bakouh, G. Planelles & M. Lanzer, (2010) PfCHA is a mitochondrial divalent cation/H⁺ antiporter in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **76**: 1591-1606.
- Sa, J. M., O. Twu, K. Hayton, S. Reyes, M. P. Fay, P. Ringwald & T. E. Wellems, (2009) Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 18883-18889.
- Saliba, K. J., R. E. Martin, A. Broer, R. I. Henry, C. S. McCarthy, M. J. Downie, R. J. Allen, K. A. Mullin, G. I. McFadden, S. Broer & K. Kirk, (2006) Sodium-dependent uptake of inorganic phosphate by the intracellular malaria parasite. *Nature* **443**: 582-585.
- Sanchez, C. P., A. Dave, W. D. Stein & M. Lanzer, (2010) Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* **40**: 1109-1118.
- Sanchez, C. P., J. E. McLean, P. Rohrbach, D. A. Fidock, W. D. Stein & M. Lanzer, (2005) Evidence for a pfert-associated chloroquine efflux system in the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* **44**: 9862-9870.
- Sanchez, C. P., J. E. McLean, W. Stein & M. Lanzer, (2004) Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry* **43**: 16365-16373.
- Sanchez, C. P., P. Rohrbach, J. E. McLean, D. A. Fidock, W. D. Stein & M. Lanzer, (2007a) Differences in trans-stimulated chloroquine efflux kinetics are linked to PfCRT in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **64**: 407-420.
- Sanchez, C. P., A. Rotmann, W. D. Stein & M. Lanzer, (2008) Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **70**: 786-798.
- Sanchez, C. P., W. Stein & M. Lanzer, (2003) Trans stimulation provides evidence for a drug efflux carrier as the mechanism of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* **42**: 9383-9394.
- Sanchez, C. P., W. D. Stein & M. Lanzer, (2007b) Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* **23**: 332-339.

- Saridaki, T., K. S. Frohlich, C. Braun-Breton & M. Lanzer, (2009) Export of PfSBP1 to the Plasmodium falciparum Maurer's clefts. *Traffic* **10**: 137-152.
- Schlitzer, M., (2007) Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem* **2**: 944-986.
- Schlitzer, M., (2008) Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. *Arch Pharm (Weinheim)* **341**: 149-163.
- Schlitzer, M., (2009a) Medizinische Chemie der Wirkstoffe gegen Malaria. *Pharmazie in unserer Zeit* **38**: 512-520.
- Schlitzer, M., (2009b) Wirkstoffe gegen Malaria: Was ist in der Pipeline? *Pharmazie in unserer Zeit* **38**: 522-526.
- Scotto, G., (2010) Aggiornamenti sulla malaria; Malaria: an update. *Infez Med* **18**: 213-234.
- Segel, I. H., (1993) Enzyme Kinetics - Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. *Wiley Classics Library*.
- Sharma, S., A. Pradhan, V. S. Chauhan & R. Tuteja, (2005) Isolation and characterization of type I signal peptidase of different malaria parasites. *J Biomed Biotechnol* **2005**: 301-309.
- Sidhu, A. B., A. C. Uhlemann, S. G. Valderramos, J. C. Valderramos, S. Krishna & D. A. Fidock, (2006) Decreasing pfmdr1 copy number in Plasmodium falciparum malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis* **194**: 528-535.
- Sidhu, A. B., S. G. Valderramos & D. A. Fidock, (2005) pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **57**: 913-926.
- Sidhu, A. B., D. Verdier-Pinard & D. A. Fidock, (2002) Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum malaria parasites conferred by pfcrt mutations. *Science* **298**: 210-213.
- Singh, B., L. Kim Sung, A. Matusop, A. Radhakrishnan, S. S. Shamsul, J. Cox-Singh, A. Thomas & D. J. Conway, (2004) A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet* **363**: 1017-1024.
- Smith, J. D., C. E. Chitnis, A. G. Craig, D. J. Roberts, D. E. Hudson-Taylor, D. S. Peterson, R. Pinches, C. I. Newbold & L. H. Miller, (1995) Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* **82**: 101-110.
- Smith, L. D., W. L. Xu & R. L. Varnold, (1991) Oogenesis and oocyte isolation. *Methods Cell Biol* **36**: 45-60.
- Spielmann, T., P. L. Hawthorne, M. W. Dixon, M. Hannemann, K. Klotz, D. J. Kemp, N. Klonis, L. Tilley, K. R. Trenholme & D. L. Gardiner, (2006) A cluster of ring stage-specific genes linked to a locus implicated in cytoadherence in Plasmodium falciparum codes for PEXEL-negative and PEXEL-positive proteins exported into the host cell. *Mol Biol Cell* **17**: 3613-3624.
- Spycher, C., N. Klonis, T. Spielmann, E. Kump, S. Steiger, L. Tilley & H. P. Beck, (2003) MAHRP-1, a novel Plasmodium falciparum histidine-rich protein, binds ferriprotoporphyrin IX and localizes to the Maurer's clefts. *J Biol Chem* **278**: 35373-35383.
- Spycher, C., M. Rug, N. Klonis, D. J. Ferguson, A. F. Cowman, H. P. Beck & L. Tilley, (2006) Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Mol Cell Biol* **26**: 4074-4085.

- Srivastava, I. K., J. M. Morrisey, E. Darrouzet, F. Daldal & A. B. Vaidya, (1999) Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol* **33**: 704-711.
- Stein, W. D., (1986) Transport and diffusion across cell membranes. *Academic Press, Inc.*
- Stich, (2009) Malaria. *Pharmazie in unserer Zeit* **38**: 508-511.
- Stich, A., K. Fischer & M. Lanzer, (2000) Die Überlebensstrategie des Malariaerregers. *Biol. in unserer Zeit* **30**: 194-201.
- Struck, N. S., S. de Souza Dias, C. Langer, M. Marti, J. A. Pearce, A. F. Cowman & T. W. Gilberger, (2005) Re-defining the Golgi complex in Plasmodium falciparum using the novel Golgi marker PfGRASP. *J Cell Sci* **118**: 5603-5613.
- Su, X. Z., V. M. Heatwole, S. P. Wertheimer, F. Guinet, J. A. Herrfeldt, D. S. Peterson, J. A. Ravetch & T. E. Wellems, (1995) The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell* **82**: 89-100.
- Sullivan, D. J., (2002) Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol* **32**: 1645-1653.
- Summers, R. L. & R. E. Martin, (2010) Functional characteristics of the malaria parasite's "chloroquine resistance transporter": implications for chemotherapy. *Virulence* **1**: 304-308.
- Summers, R. L., M. N. Nash & R. E. Martin, (2012) Know your enemy: understanding the role of PfCRT in drug resistance could lead to new antimalarial tactics. *Cell Mol Life Sci*.
- Tanariya, P., P. Tippawangkoso, J. Karbwang, K. Na-Bangchang & W. H. Wernsdorfer, (2000) In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum and clinical response to lumefantrine (benflumetol) and artemether. *Br J Clin Pharmacol* **49**: 437-444.
- Taylor, W. R., T. L. Richie, D. J. Fryauff, C. Ohrt, H. Picarima, D. Tang, G. S. Murphy, H. Widjaja, D. Braitman, E. Tjitra, A. Ganjar, T. R. Jones, H. Basri & J. Berman, (2003) Tolerability of azithromycin as malaria prophylaxis in adults in northeast papua, indonesia. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2199-2203.
- Taylor, W. R. & N. J. White, (2004) Antimalarial drug toxicity: a review. *Drug Saf* **27**: 25-61.
- Tilley, L., R. Sougrat, T. Lithgow & E. Hanssen, (2008) The twists and turns of Maurer's cleft trafficking in P. falciparum-infected erythrocytes. *Traffic* **9**: 187-197.
- Touze, J. E., P. Heno, L. Fourcade, J. C. Deharo, G. Thomas, S. Bohan, P. Paule, P. Riviere, E. Kouassi & A. Buguet, (2002) The effects of antimalarial drugs on ventricular repolarization. *Am J Trop Med Hyg* **67**: 54-60.
- Tuteja, R., (2007) Malaria - an overview. *Febs J* **274**: 4670-4679.
- Ursos, L. M., S. M. Dzekunov & P. D. Roepe, (2000) The effects of chloroquine and verapamil on digestive vacuolar pH of P. falciparum either sensitive or resistant to chloroquine. *Mol Biochem Parasitol* **110**: 125-134.
- Vaidya, A. B. & M. W. Mather, (2000) Atovaquone resistance in malaria parasites. *Drug Resist Updat* **3**: 283-287.
- Valderramos, S. G., J. C. Valderramos, L. Musset, L. A. Purcell, O. Mercereau-Puijalon, E. Legrand & D. A. Fidock, (2010) Identification of a mutant PfCRT-mediated chloroquine tolerance phenotype in Plasmodium falciparum. *PLoS Pathog* **6**: e1000887.
- Vera, J. C. & O. M. Rosen, (1989) Functional expression of mammalian glucose transporters in Xenopus laevis oocytes: evidence for cell-dependent insulin sensitivity. *Mol Cell Biol* **9**: 4187-4195.

- Viebig, N. K., E. Levin, S. Dechavanne, S. J. Rogerson, J. Gysin, J. D. Smith, A. Scherf & B. Gamain, (2007) Disruption of var2csa gene impairs placental malaria associated adhesion phenotype. *PLoS One* **2**: e910.
- Wahlgren, M., J. Carlson, H. Helmby, I. Hedlund & C. J. Treutiger, (1992) Molecular mechanisms and biological importance of Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **87 Suppl 3**: 323-329.
- Warhurst, D. C., J. C. Craig & I. S. Adagu, (2002) Lysosomes and drug resistance in malaria. *Lancet* **360**: 1527-1529.
- Wellems, T. E. & C. V. Plowe, (2001) Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* **184**: 770-776.
- Wenk, P. & A. Renz, (2003) Parasitologie, Biologie der Humanparasiten. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York*.
- WHO, (2005) Susceptibility of *P. falciparum* to antimalarial drugs, Report on global monitoring 1996 - 2004.
- WHO, (2010) Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000 - 2010.
- WHO, (2011) World malaria report 2011.
- WHO, (2012) World malaria report 2012.
- Wickert, H. & G. Krohne, (2007) The complex morphology of Maurer's clefts: from discovery to three-dimensional reconstructions. *Trends Parasitol* **23**: 502-509.
- Wiesner, J., R. Ortmann, H. Jomaa & M. Schlitzer, (2003) Neue Antimalaria-Wirkstoffe. *Angewandte Chemie* **115**: 5432-5451.
- Wilairatana, P., D. E. Kyle, S. Looareesuwan, K. Chinwongprom, S. Amradee, N. J. White & W. M. Watkins, (1997) Poor efficacy of antimalarial biguanide-dapsone combinations in the treatment of acute, uncomplicated, falciparum malaria in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* **91**: 125-132.
- Wilson, K. & K. H. Goulding, (1991) Methoden der Biochemie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*.
- Wootton, J. C., X. Feng, M. T. Ferdig, R. A. Cooper, J. Mu, D. I. Baruch, A. J. Magill & X. Z. Su, (2002) Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Plasmodium falciparum. *Nature* **418**: 320-323.
- Xenopus-express, <http://www.xenopus.com/xenopusfrog.jpg> (letzter Zugriff: 08.04.2013).
- XLAB, <http://www.xlab-goettingen.de/neurocamp.html> (letzter Zugriff: 08.04.2013).
- Yayon, A., Z. I. Cabantchik & H. Ginsburg, (1984) Identification of the acidic compartment of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *Embo J* **3**: 2695-2700.
- Yayon, A., Z. I. Cabantchik & H. Ginsburg, (1985) Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 2784-2788.
- Zhang, H., M. Paguio & P. D. Roepe, (2004) The antimalarial drug resistance protein Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter binds chloroquine. *Biochemistry* **43**: 8290-8296.
- Zishiri, V. K., M. C. Joshi, R. Hunter, K. Chibale, P. J. Smith, R. L. Summers, R. E. Martin & T. J. Egan, (2011) Quinoline antimalarials containing a dibemethin group are active against chloroquinone-resistant Plasmodium falciparum and inhibit chloroquine transport via the P. falciparum chloroquine-resistance transporter (PfCRT). *J Med Chem* **54**: 6956-6968.

7. Anhang

7.1. Aminosäure- und DNA-Sequenzen

7.1.1. PfCRT^{HB3}

P. falciparum cds

ATGAAGTTCGCCTCTAAGAAGAACAATCAAAAAGAACTCCTCCAAGAATGCTGAAAGAGCTAGAGCTGCTGATAAT
GCTGCTCAAGAAGGTAACGGTCTAGATTGGGTGGTGGTCTTGTGTTGGGTAAATGTGCTCATGCTGCTAAAGCT
GCCTTCAAAGAAATCAAGGACAACATCTTCATCTACATCTTGTCCATCATCTACTTGTCTGTTTGCCTCATGAAC
AAGATTTTCGCCAAGAGAACCTTGAACAAGATTGGTAACACTACTCTTTCGTTACCTCTGAAACCCATAACTTCATC
TGCATGATCATGTTCTTCATCGTCTATTCCCTTGTTCGGTAACAAGAAGGGTAACTCCAAAAGAAAGACACAGATCC
TTCAACTTGCAATTCTTCGCCATTTCTATGTTGGATGCCTGCTCTGTTATTTTGGCTTTCATCGGTTTACTAGTA
ACTACCGGTAACATCCAATCTTTCGTCTTGCAATTGTCCATTCCAATCAATATGTTCTTCTGCTTCTTGATCTTG
AGATACAGATAACCACTTGTACAATTACTTGGGTGCCGTTATTATTGTGCTTACCATTGCCTTGGTTGAAATGAAG
TTGTCCTTCGAAACCCAAGAAGAAAACCTCCATCATCTTCAACTTGGTTTTGTATTTCGCTTGTATTCCAGTTTGT
TTCTCCAACATGACCAGAGAAATCGTTTTCAAGAAGTACAAGATCGACATCTTGAGATTGAACGCTATGGTTTCC
TTCTTCCAATTATTACCTCCTGCTTGTATTGTTGCCAGTTTACACCTTGCCATTCTTGAAGCAATTGCACTTGCCA
TACAACGAAATTTGGACCAACATCAAGAATGGTTTCGCTTGTGTTGTTCTTGGGTAGAAACACCGTGTGTTGAAAC
TGTGGTTTTGGGTATGGCTAAGTTGTGTGATGATTGTGATGGTGTCTTGGAAAACCTTTCGCTTGTCTCCTTCTTC
AACATCTGCGATAACTTGATTACCTCCTACATCATCGATAAGTTCTCTACTATGACCTACACCATCGTTTCTTGT
ATTCAAGGTCCAGCTATTGCTATTGCCTACTACTTCAAGTTTTTGGCCGGTGATGTTGTTAGAGAACCTAGATTA
TTGGACTTCGTACCTTGTGTTGGTTACTTGTTCGGTTCATTATCTACAGAGTCGGTAACATCATCTTGGAAAGA
AAGAAGATGAGAAACGAAGAAAACGCTGATTCTGCTGGTGTCTTGGACTAATGTTGATTCTGCTGCTACTCAACCT
AGGTAA

P. falciparum Aminosäuresequenz

MKFAASKNNQKNSKNAERARAADNAAQEGNGSRLGGGSLGKCAHAAKAAFKEIKDNIFYIILSIYLSVCMN
KIFAKRTLKIGNYSFVTSETHNFI CIMIFFIVYSLFGNKKGNSKERHRSFNLQFFAISMLDACSIVILAF IGLTR
TTGNIQSFVLQLSIPINMFFCFILIRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIFNLVLISALIPVC
FSNMTREIVFKKYKIDILRLNAMVSFFQLFTSCLILPVYTLPLFKLQLHLPYNEIWTNINKNGFACFLFGRNTVVEN
CGLGMAKLCDDCDGAWKTFALFSFFNICDNLITSYIIDKFSMTMYTIVSCIQGPAIAIAYYFKFLAGDVVREPR
LDFVTLFGYLFSGSIYRVGNII LERKKMRNEENADSAGALTNVDSAATQPR*

Oozyten optimierte cds

ATGAAGTTCGCCTCTAAGAAGAACAATCAAAAAGAACTCCTCCAAGAATGCTGAAAGAGCTAGAGCTGCTGATAAT
GCTGCTCAAGAAGGTAACGGTCTAGATTGGGTGGTGGTCTTGTGTTGGGTAAATGTGCTCATGCTGCTAAAGCT
GCCTTCAAAGAAATCAAGGACAACATCTTCATCTACATCTTGTCCATCATCTACTTGTCTGTTTGCCTCATGAAC
AAGATTTTCGCCAAGAGAACCTTGAACAAGATTGGTAACACTACTCTTTCGTTACCTCTGAAACCCATAACTTCATC
TGCATGATCATGTTCTTCATCGTCTATTCCCTTGTTCGGTAACAAGAAGGGTAACTCCAAAAGAAAGACACAGATCC
TTCAACTTGCAATTCTTCGCCATTTCTATGTTGGATGCCTGCTCTGTTATTTTGGCTTTCATCGGTTTACTAGTA
ACTACCGGTAACATCCAATCTTTCGTCTTGCAATTGTCCATTCCAATCAATATGTTCTTCTGCTTCTTGATCTTG
AGATACAGATAACCACTTGTACAATTACTTGGGTGCCGTTATTATTGTGCTTACCATTGCCTTGGTTGAAATGAAG
TTGTCCTTCGAAACCCAAGAAGAAAACCTCCATCATCTTCAACTTGGTTTTGTATTTCGCTTGTATTCCAGTTTGT
TTCTCCAACATGACCAGAGAAATCGTTTTCAAGAAGTACAAGATCGACATCTTGAGATTGAACGCTATGGTTTCC
TTCTTCCAATTATTACCTCCTGCTTGTATTGTTGCCAGTTTACACCTTGCCATTCTTGAAGCAATTGCACTTGCCA
TACAACGAAATTTGGACCAACATCAAGAATGGTTTCGCTTGTGTTGTTCTTGGGTAGAAACACCGTGTGTTGAAAC
TGTGGTTTTGGGTATGGCTAAGTTGTGTGATGATTGTGATGGTGTCTTGGAAAACCTTTCGCTTGTCTCCTTCTTC
AACATCTGCGATAACTTGATTACCTCCTACATCATCGATAAGTTCTCTACTATGACCTACACCATCGTTTCTTGT
ATTCAAGGTCCAGCTATTGCTATTGCCTACTACTTCAAGTTTTTGGCCGGTGATGTTGTTAGAGAACCTAGATTA
TTGGACTTCGTACCTTGTGTTGGTTACTTGTTCGGTTCATTATCTACAGAGTCGGTAACATCATCTTGGAAAGA
AAGAAGATGAGAAACGAAGAAAACGCTGATTCTGCTGGTGTCTTGGACTAATGTTGATTCTGCTGCTACTCAACCT
AGGTAA

Oozyten optimierte Aminosäuresequenz

MKFASKKNNQKNSKNAERARAADNAAQEGNGSRLGGGSLGKCAHAAKAAFKEIKDNIFYIILSIYLSVCMN
 KIFAKRTLNKIGNYSFVTSETHNFI CMIMFFIVYSLFGNKKGNSKERHRSFNLQFFAISMLDACSILAF IGLTR
 TTGNIQSFVLQLSIPINMFFCFLILRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIFNLVLISALIPVC
 FSNMTREIVFKKYKIDILRLNAMVSFFQLFTSCLILPVYTLPLKQLHLPYNEIWTNIKNGFACFLGRNTVVEN
 CGLGMAKLCDDCDGAWKTFALFSFFNICDNLITSYIIDKFSTMTYTI VSCIQGPALAIAYYFKFLAGDVVREPR
 LDFVTLFGYLFSGSI IYRVGNI ILERKKMRNEENADSAGALTNVDSAATQPR *

7.1.2. PfCRT^{Dd2}***P. falciparum* cds**

ATGAAGTTCGCCTCTAAGAAGAACAATCAAAAAGAACTCCTCCAAGAATGCTGAAAGAGCTAGAGCTGCTGATAAT
 GCTGCTCAAGAAGGTAACGGTCTAGATTGGGTGGTGGTCTTGTGTTGGGTAAATGTGCTCATGCTGCTAAAGCT
 GCCTTCAAAGAAATCAAGGACAACATCTTCATCTACATCTTGTCCATCATCTACTTGTCCGTTTGCCTTATTGAA
 ACCATCTTCGCCAAGAGAACCTTGAACAAGATTGGTAACACTACTCTTTCGTTACCTCTGAAACCCATAACTTCATC
 TGCATGATCATGTTCTTCATCGTCTATTCTTGTTCGGTAACAAGAAGGGTAACTCCAAAAGAAAGACACAGATCC
 TTCAACTTGCAATTCTTCGCCATTTCTATGTTGGATGCCTGCTCTGTTATTTTGGCTTTCATCGGTTTACTAGA
 ACTACCGGTAACATCCAATCTTTCGTCTTGCAATTGTCCATTCCAATCAATATGTTCTTCTGCTTCTTGATCTTG
 AGATACAGATAACCACTTGTACAATTACTTGGGTGCCGTTATTATTGTGCTTACCATTGCCTTGGTTGAAATGAAG
 TTGTCTTCGAAACCCAAGAAGAAAACCTCCATCATCTTCAACTTGGTTTTGTATCTCCTCATTGATCCCAGTTTGT
 TTCTCTAACATGACCAGAGAAATCGTTTTCAAGAAGTACAAGATCGACATCTTGAGATTGAACGCTATGGTTTCC
 TTCTTCCAATTATTCACCTCCTGCTTGATTTTGCAGTTTACACCTTGCCATTCTTGAAAGAATTGCACTTGCCA
 TACAACGAAATTTGGACCAACATCAAGAATGGTTTCGCTTGTGTTGTTCTTGGGTAGAAACACCGTTGTTGAAAAC
 TGTGGTTTTGGGTATGGCTAAGTTGTGTGATGATTGTGATGGTGTGTTGGAAAACCTTTCGCTTGTCTCCTTCTTC
 TCCATTTGCGATAACTTGATCACCTCCTACATTATCGATAAGTTCTCCACTATGACCTACACTATCGTATCTTGC
 ATTCAAGGTCCAGCTACTGCTATTGCTTACTACTTCAAGTTCTTGGCTGGTGATGTTGTTATTGAACCTAGATTA
 TTGGACTTCGTCACCTTGTGTTGTTACTTGTTCGGTTCCATTATCTACAGAGTCGGTAACATCATCTTGGAAAGA
 AAGAAGATGAGAAACGAAGAAAACGCTGATTCTGCTGGTGCTTTGACTAATGTTGATTCTGCTGCTACTCAACCT
 AGGTAA

***P. falciparum* Aminosäuresequenz**

MKFASKKNNQKNSKNAERARAADNAAQEGNGSRLGGGSLGKCAHAAKAAFKEIKDNIFYIILSIYLSVCMN
 TIFAKRTLNKIGNYSFVTSETHNFI CMIMFFIVYSLFGNKKGNSKERHRSFNLQFFAISMLDACSILAF IGLTR
 TTGNIQSFVLQLSIPINMFFCFLILRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIFNLVLISLIPVC
 FSNMTREIVFKKYKIDILRLNAMVSFFQLFTSCLILPVYTLPLKQLHLPYNEIWTNIKNGFACFLGRNTVVEN
 CGLGMAKLCDDCDGAWKTFALFSFFSICDNLITSYIIDKFSTMTYTI VSCIQGPATAIAYYFKFLAGDVVIEPR
 LDFVTLFGYLFSGSI IYRVGNI ILERKKMRNEENADSAGALTNVDSAATQPR *

Oozyten optimierte cds

ATGAAGTTCGCCTCTAAGAAGAACAATCAAAAAGAACTCCTCCAAGAATGCTGAAAGAGCTAGAGCTGCTGATAAT
 GCTGCTCAAGAAGGTAACGGTCTAGATTGGGTGGTGGTCTTGTGTTGGGTAAATGTGCTCATGCTGCTAAAGCT
 GCCTTCAAAGAAATCAAGGACAACATCTTCATCTACATCTTGTCCATCATCTACTTGTCCGTTTGCCTTATTGAA
 ACCATCTTCGCCAAGAGAACCTTGAACAAGATTGGTAACACTACTCTTTCGTTACCTCTGAAACCCATAACTTCATC
 TGCATGATCATGTTCTTCATCGTCTATTCTTGTTCGGTAACAAGAAGGGTAACTCCAAAAGAAAGACACAGATCC
 TTCAACTTGCAATTCTTCGCCATTTCTATGTTGGATGCCTGCTCTGTTATTTTGGCTTTCATCGGTTTACTAGA
 ACTACCGGTAACATCCAATCTTTCGTCTTGCAATTGTCCATTCCAATCAATATGTTCTTCTGCTTCTTGATCTTG
 AGATACAGATAACCACTTGTACAATTACTTGGGTGCCGTTATTATTGTGCTTACCATTGCCTTGGTTGAAATGAAG
 TTGTCTTCGAAACCCAAGAAGAAAACCTCCATCATCTTCAACTTGGTTTTGTATCTCCTCATTGATCCCAGTTTGT
 TTCTCTAACATGACCAGAGAAATCGTTTTCAAGAAGTACAAGATCGACATCTTGAGATTGAACGCTATGGTTTCC
 TTCTTCCAATTATTCACCTCCTGCTTGATTTTGCAGTTTACACCTTGCCATTCTTGAAAGAATTGCACTTGCCA
 TACAACGAAATTTGGACCAACATCAAGAATGGTTTCGCTTGTGTTGTTCTTGGGTAGAAACACCGTTGTTGAAAAC
 TGTGGTTTTGGGTATGGCTAAGTTGTGTGATGATTGTGATGGTGTGTTGGAAAACCTTTCGCTTGTCTCCTTCTTC
 TCCATTTGCGATAACTTGATCACCTCCTACATTATCGATAAGTTCTCCACTATGACCTACACTATCGTATCTTGC
 ATTCAAGGTCCAGCTACTGCTATTGCTTACTACTTCAAGTTCTTGGCTGGTGATGTTGTTATTGAACCTAGATTA
 TTGGACTTCGTCACCTTGTGTTGTTACTTGTTCGGTTCCATTATCTACAGAGTCGGTAACATCATCTTGGAAAGA
 AAGAAGATGAGAAACGAAGAAAACGCTGATTCTGCTGGTGCTTTGACTAATGTTGATTCTGCTGCTACTCAACCT
 AGGTAA

Oozyten optimierte Aminosäuresequenz

MKFASKKNNQKNSKNAERARAADNAAQEGNGSRLGGGSLGKCAHAAKAAFKEIKDNIFYILSIYLSVLCVIE
 TIFAKRTLNKIGNYSFVTSETHNFICMIMFFIVYSLFGNKKGNSKERHRSFNLQFFAISMLDACSILAFIGLTR
 TTGNIQSFVLQLSIPINMFFCFLILRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIFNLVLISSLI
 PVSFNTREIVFKKYKIDILRLNAMVSFFQLFTSCLILPVYTLPLKELHLPYNEIWTNIKNGFACLF
 LGRNTVVEN
 CGLGMAKLCDDCDGAWKTFALFSFFSICDNLITSYIIDKFSTMTYTIIVSCIQGPATAIAYYFKFLAGDVVIEPRL
 LDFVTLFGYLFSGSIYRVGNIIERKKMRNEENADSAGALTNVDSAATQPR *

7.1.3. PfCRT^{GB4}***P. falciparum* cds**

ATGAAGTTCGCCTCTAAGAAGAACAATCAAAAAGAACTCCTCCAAGAATGCTGAAAGAGCTAGAGCTGCTGATAAT
 GCTGCTCAAGAAGGTAACGGTCTAGATTGGGTGGTGGTCTTGTGTTGGGTAAATGTGCTCATGCTGCTAAAGCT
 GCCTTCAAAGAAATCAAGGACAACATCTTCATCTACATCTTGTCCATCATCTACTTGTCCGTTTGCCTTATTGAA
 ACCATCTTCGCCAAGAGAACCTTGAACAAGATTGGTAACACTACTCTTTCGTTACCTCTGAAACCCATAACTTCATC
 TGCATGATCATGTTCTTCATCGTCTATTCTTGTTCGGTAACAAGAAGGGTAACTCCAAAAGAAAGACACAGATCC
 TTCAACTTGCAATTCTTCGCCATTTCTATGTTGGATGCCTGCTCTGTTATTTTGGCTTTCATCGGTTTACTAGA
 ACTACCGGTAACATCCAATCTTTCGTCTTGCAATTGTCCATTCCAATCAATATGTTCTTCTGCTTCTTGATCTTG
 AGATACAGATAACCACTTGTACAATTACTTGGGTGCCGTTATTATTGTGCTTACCATTGCCTTGGTTGAAATGAAG
 TTGTCTTCGAAACCCAAGAAGAAAACCTCCATCATCTTCAACTTGGTTTTGTATCTCCTCATTGATCCCAGTTTGT
 TTCTCTAACATGACCAGAGAAATCGTTTTCAAGAAGTACAAGATCGACATCTTGAGATTGAACGCTATGGTTTCC
 TTCTTCCAATTATTACCTCCTGCTTGTATTTGCCAGTTTACACCTTGCCATTCTTGAAAGAATTGCACTTGCCA
 TACAACGAAATTTGGACCAACATCAAGAATGGTTTTGCTTGTGTTGTTCTTGGGTAGAAACACCGTTGTTGAAAAC
 TGTGGTTTTGGGTATGGCTAAGTTGTGTGATGATTGTGATGGTGTGTTGGAAAACCTTTCGCTTGTCTCCTTCTTC
 AACATCTGCGATAACTTGATCACCTCCTACATTATCGATAAGTTCTCCACTATGACCTACACTATCGTATCTTGC
 ATTCAAGGTCCAGCTATTGCTATTGCCTACTACTTCAAGTTCTTGGCTGGTGATGTTGTTATTGAACCTAGATTA
 TTGGACTTCGTCACCTTGTGTTGGTTACTTGTTCGGTTCCATTATCTACAGAGTCGGTAACATCATCTTGGAAAGA
 AAGAAGATGAGAAACGAAGAAAACGCTGATTCTGCTGGTGCTTTGACTAATGTTGATTCTGCTGCTACTCAACCT
 AGGTAA

***P. falciparum* Aminosäuresequenz**

MKFASKKNNQKNSKNAERARAADNAAQEGNGSRLGGGSLGKCAHAAKAAFKEIKDNIFYILSIYLSVLCVIE
 TIFAKRTLNKIGNYSFVTSETHNFICMIMFFIVYSLFGNKKGNSKERHRSFNLQFFAISMLDACSILAFIGLTR
 TTGNIQSFVLQLSIPINMFFCFLILRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIFNLVLISSLI
 PVSFNTREIVFKKYKIDILRLNAMVSFFQLFTSCLILPVYTLPLKELHLPYNEIWTNIKNGFACLF
 LGRNTVVEN
 CGLGMAKLCDDCDGAWKTFALFSFFNICDNLITSYIIDKFSTMTYTIIVSCIQGPAIAIAYYFKFLAGDVVIEPRL
 LDFVTLFGYLFSGSIYRVGNIIERKKMRNEENADSAGALTNVDSAATQPR *

Oozyten optimierte cds

ATGAAGTTCGCCTCTAAGAAGAACAATCAAAAAGAACTCCTCCAAGAATGCTGAAAGAGCTAGAGCTGCTGATAAT
 GCTGCTCAAGAAGGTAACGGTCTAGATTGGGTGGTGGTCTTGTGTTGGGTAAATGTGCTCATGCTGCTAAAGCT
 GCCTTCAAAGAAATCAAGGACAACATCTTCATCTACATCTTGTCCATCATCTACTTGTCCGTTTGCCTTATTGAA
 ACCATCTTCGCCAAGAGAACCTTGAACAAGATTGGTAACACTACTCTTTCGTTACCTCTGAAACCCATAACTTCATC
 TGCATGATCATGTTCTTCATCGTCTATTCTTGTTCGGTAACAAGAAGGGTAACTCCAAAAGAAAGACACAGATCC
 TTCAACTTGCAATTCTTCGCCATTTCTATGTTGGATGCCTGCTCTGTTATTTTGGCTTTCATCGGTTTACTAGA
 ACTACCGGTAACATCCAATCTTTCGTCTTGCAATTGTCCATTCCAATCAATATGTTCTTCTGCTTCTTGATCTTG
 AGATACAGATAACCACTTGTACAATTACTTGGGTGCCGTTATTATTGTGCTTACCATTGCCTTGGTTGAAATGAAG
 TTGTCTTCGAAACCCAAGAAGAAAACCTCCATCATCTTCAACTTGGTTTTGTATCTCCTCATTGATCCCAGTTTGT
 TTCTCTAACATGACCAGAGAAATCGTTTTCAAGAAGTACAAGATCGACATCTTGAGATTGAACGCTATGGTTTCC
 TTCTTCCAATTATTACCTCCTGCTTGTATTTGCCAGTTTACACCTTGCCATTCTTGAAAGAATTGCACTTGCCA
 TACAACGAAATTTGGACCAACATCAAGAATGGTTTTGCTTGTGTTGTTCTTGGGTAGAAACACCGTTGTTGAAAAC
 TGTGGTTTTGGGTATGGCTAAGTTGTGTGATGATTGTGATGGTGTGTTGGAAAACCTTTCGCTTGTCTCCTTCTTC
 AACATCTGCGATAACTTGATCACCTCCTACATTATCGATAAGTTCTCCACTATGACCTACACTATCGTATCTTGC
 ATTCAAGGTCCAGCTATTGCTATTGCCTACTACTTCAAGTTCTTGGCTGGTGATGTTGTTATTGAACCTAGATTA
 TTGGACTTCGTCACCTTGTGTTGGTTACTTGTTCGGTTCCATTATCTACAGAGTCGGTAACATCATCTTGGAAAGA
 AAGAAGATGAGAAACGAAGAAAACGCTGATTCTGCTGGTGCTTTGACTAATGTTGATTCTGCTGCTACTCAACCT
 AGGTAA

Oozyten optimierte Aminosäuresequenz

MKFASKKNNQKNSKNAERARAADNAAQEGNGSRLGGGSLGKCAHAAKAAFKEIKDNIFYILSIYLSVLCVIE
 TIFAKRTLNKIGNYSFVTSETHNFI CMIMFFIVYSLFGNKKGNSKERHRSFNLQFFAISMLDACSIVLAF IGLTR
 TTGNIQSFVLQLSIPINMFFCFLILRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIFNLVLISSLI PVC
 FSNMTREIVFKKYKIDILRLNAMVSFFQLFTSCLILPVYTLPLFLKELHLPYNEIWTNIKNGFACLF LGRNTVVEN
 CGLGMAKLCDDCDGAWKTFALFSFFNICDNLITSYI IDKFSTMTYTIVSCIQGPALAIAYYFKFLAGDVVIEPRL
 LDFVTLFGYLFSGSI IYRVGNII LERKKMRNEENADSAGALTNVDSAATQPR *

7.1.4. PfCRT^{Ecu110}***P. falciparum* cds**

ATGAAGTTCGCCTCTAAGAAGAACAATCAAAAAGAACTCCTCCAAGAATGCTGAAAGAGCTAGAGCTGCTGATAAT
 GCTGCTCAAGAAGGTAACGGTCTAGATTGGGTGGTGGTCTTGTGGGTAAATGTGCTCATGCTGCTAAAGCT
 GCCTTCAAAGAAATCAAGGACAACATCTTCATCTACATCTTGTCCATCATCTACTTGTCCGTTTGCCTCATGAAC
 ACGATTTTCGCCAAGAGAACCTTGAACAAGATTGGTAACACTACTCTTTCGTTACCTCTGAAACCCATAACTTCATC
 TGCATGATCATGTTCTTCATCGTCTATTCTTGTTCGGTAACAAGAAGGGTAACTCCAAAAGAAAGACACAGATCC
 TTCAACTTGCAATTCTTCGCCATTTCTATGTTGGATGCCTGCTCTGTTATTTTGGCTTTCATCGGTTTACTAGA
 ACTACCGGTAACATCCAATCTTTCGTCTTGCAATTGTCCATTCCAATCAATATGTTCTTCTGCTTCTTGATCTTG
 AGATACAGATAACCACTTGTACAATTACTTGGGTGCCGTTATTATTGTGCTTACCATTGCCTTGGTTGAAATGAAG
 TTGTCTTCGAAACCCAAGAAGAAAACCTCCATCATCTTCAACTTGGTTTTGATTTCTCATGATTCCAGTTTGT
 TTCTCCAACATGACCAGAGAAATCGTTTTCAAGAAGTACAAGATCGACATCTTGAGATTGAACGCTATGGTTTCC
 TTCTTCCAATTATTACCTCCTGCTTGGATTTTGCAGTTTACACCTTGCCATTCTTGAAGCAATTGCACTTGCCA
 TACAACGAAATTTGGACCAACATCAAGAATGGTTTTCGCTTGTGTTGTTCTTGGGTAGAAACACCGTTGTTGAAAAC
 TGTGGTTTTGGGTATGGCTAAGTTGTGTGATGATTGTGATGGTGTGTTGGAAAACCTTTCGCTTGTCTCCTTCTTC
 GACATCTGCGATAACTTGATTACCTCCTACATCATCGATAAGTTCTCTACTATGACCTACACCATCGTTTCTTGT
 ATTCAAGGTCCAGCTCTTGCTATTGCCTACTACTTCAAGTTTTTGGCCGGTGATGTTGTTAGAGAACCTAGATTA
 TTGGACTTCGTCACCTTGTGTTGGTTACTTGTTCGGTTCCATTATCTACAGAGTCGGTAACATCATCTTGGAAAGA
 AAGAAGATGAGAAACGAAGAAAACGCTGATTCTGCTGGTGCTTTGACTAATGTTGATTCTGCTGCTACTCAACCT
 AGGTAA

***P. falciparum* Aminosäuresequenz**

MKFASKKNNQKNSKNAERARAADNAAQEGNGSRLGGGSLGKCAHAAKAAFKEIKDNIFYILSIYLSVLCVMN
 TIFAKRTLNKIGNYSFVTSETHNFI CMIMFFIVYSLFGNKKGNSKERHRSFNLQFFAISMLDACSIVLAF IGLTR
 TTGNIQSFVLQLSIPINMFFCFLILRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIFNLVLISSLI PVC
 FSNMTREIVFKKYKIDILRLNAMVSFFQLFTSCLILPVYTLPLFLKQLHLPYNEIWTNIKNGFACLF LGRNTVVEN
 CGLGMAKLCDDCDGAWKTFALFSFFDICDNLITSYI IDKFSTMTYTIVSCIQGPALAIAYYFKFLAGDVVREPRL
 LDFVTLFGYLFSGSI IYRVGNII LERKKMRNEENADSAGALTNVDSAATQPR *

Oozyten optimierte cds

ATGAAGTTCGCCTCTAAGAAGAACAATCAAAAAGAACTCCTCCAAGAATGCTGAAAGAGCTAGAGCTGCTGATAAT
 GCTGCTCAAGAAGGTAACGGTCTAGATTGGGTGGTGGTCTTGTGGGTAAATGTGCTCATGCTGCTAAAGCT
 GCCTTCAAAGAAATCAAGGACAACATCTTCATCTACATCTTGTCCATCATCTACTTGTCCGTTTGCCTCATGAAC
 ACGATTTTCGCCAAGAGAACCTTGAACAAGATTGGTAACACTACTCTTTCGTTACCTCTGAAACCCATAACTTCATC
 TGCATGATCATGTTCTTCATCGTCTATTCTTGTTCGGTAACAAGAAGGGTAACTCCAAAAGAAAGACACAGATCC
 TTCAACTTGCAATTCTTCGCCATTTCTATGTTGGATGCCTGCTCTGTTATTTTGGCTTTCATCGGTTTACTAGA
 ACTACCGGTAACATCCAATCTTTCGTCTTGCAATTGTCCATTCCAATCAATATGTTCTTCTGCTTCTTGATCTTG
 AGATACAGATAACCACTTGTACAATTACTTGGGTGCCGTTATTATTGTGCTTACCATTGCCTTGGTTGAAATGAAG
 TTGTCTTCGAAACCCAAGAAGAAAACCTCCATCATCTTCAACTTGGTTTTGATTTCTCATGATTCCAGTTTGT
 TTCTCCAACATGACCAGAGAAATCGTTTTCAAGAAGTACAAGATCGACATCTTGAGATTGAACGCTATGGTTTCC
 TTCTTCCAATTATTACCTCCTGCTTGGATTTTGCAGTTTACACCTTGCCATTCTTGAAGCAATTGCACTTGCCA
 TACAACGAAATTTGGACCAACATCAAGAATGGTTTTCGCTTGTGTTGTTCTTGGGTAGAAACACCGTTGTTGAAAAC
 TGTGGTTTTGGGTATGGCTAAGTTGTGTGATGATTGTGATGGTGTGTTGGAAAACCTTTCGCTTGTCTCCTTCTTC
 GACATCTGCGATAACTTGATTACCTCCTACATCATCGATAAGTTCTCTACTATGACCTACACCATCGTTTCTTGT
 ATTCAAGGTCCAGCTCTTGCTATTGCCTACTACTTCAAGTTTTTGGCCGGTGATGTTGTTAGAGAACCTAGATTA
 TTGGACTTCGTCACCTTGTGTTGGTTACTTGTTCGGTTCCATTATCTACAGAGTCGGTAACATCATCTTGGAAAGA
 AAGAAGATGAGAAACGAAGAAAACGCTGATTCTGCTGGTGCTTTGACTAATGTTGATTCTGCTGCTACTCAACCT
 AGGTAA

Oozyten optimierte Aminosäuresequenz

MKFASKKNNQKNSSKNAERARAADNAAQEGNGSRLGGGSLGKCAHAAKAAFKEIKDNIFYIYLSIIYLSVCVMN
TIFAKRTLNKIGNYSFVTSETHNFICMIMFFIVYSLFGNKKGNSKERHRSFNLQFFAISMLDACSVILAFIGLTR
TTGNIQSFVLQLSIPINMFFCFLILRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIFNLVLISSLIPVC
FSNMTREIVFKKYKIDILRLNAMVSFFQLFTSCLILPVYTLPLFKLQLHLPYNEIWTNIKNGFACFLGRNTVVEN
CGLGMAKLCDDCDGAWKTFALFSFFDIDCNLITSYIIDKFSTMTYTIVSCIQGPALAIAYYFKFLAGDVVREPR
LDFVTLFGYLFSGSIYRVGNIIERKKMRNEENADSAGALTNVDSAATQPR*

7.2. Verwendete Oligonukleotide

Die folgende Liste zeigt alle für die Amplifikation der verschiedenen PfCRT Varianten benötigten Oligonukleotide (1 - 64). Die für die in PfCRT einzufügenden Mutationen notwendigen Nukleotide sind in rot dargestellt. Oligonukleotide 65 - 68 wurden zur Sequenzierung der jeweiligen PfCRT-Sequenzen durch die Firma GATC verwendet. Die Namensgebung der Oligonukleotide steht für die an der jeweiligen Position bzw. Positionen eingefügte Mutation.

#	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	#	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
1	5'Globin FP	GCAGAAGCTCAGAATAAACG	35	PfCRT T76A RP	CTCTTGGCGAAGATGGCTTC
2	3'Globin RP	GTAGCTTAGAGACTCCATTCC	36	PfCRT T76A FP	GCGTTATTGAAGCCATCTTCG
3	PfCRT T76R RP	CTCTTGGCGAAGATCTTTC	37	PfCRT T76G RP	CTCTTGGCGAAGATCCCTTC
4	PfCRT T76R FP	GCGTTATTGAAAAGATCTTCG	38	PfCRT T76G FP	GCGTTATTGAAAGGATCTTCG
5	PfCRT T76K RP	CTCTTGGCGAAGATCTTTC	39	PfCRT T76P RP	CTCTTGGCGAAGATGGGTTC
6	PfCRT T76K FP	GCGTTATTGAAAAGATCTTCG	40	PfCRT T76P FP	GCGTTATTGAACCCATCTTCG
7	PfCRT T76H RP	CTCTTGGCGAAGATGTCTTC	41	PfCRT I74M RP	CGAAGATGGTTTCCATAACGC
8	PfCRT T76H FP	GCGTTATTGAAACATCTTCG	42	PfCRT I74M FP	GCGTTATGGAAACCATCTTCG
9	PfCRT T76E RP	CTCTTGGCGAAGATCTTTC	43	PfCRT E75N RP	GATGGTGTAAATAACGCAAACG
10	PfCRT T76E FP	GCGTTATTGAAAGATCTTCG	44	PfCRT E75N FP	CGTTTGCCTTATTAAACCATC
11	PfCRT T76D RP	CTCTTGGCGAAGATGTCTTC	45	PfCRT I74M-E75N RP	CTTGGCGAAGATGGTGTTCATAAC
12	PfCRT T76D FP	GCGTTATTGAAACATCTTCG	46	PfCRT I74M-E75N FP	GTTATGAACCCATCTTCGCCAAG
13	PfCRT T76Y RP	CTCTTGGCGAAGATGATTC	47	PfCRT S220A RP	CTGGGATCAATGGGAGATC
14	PfCRT T76Y FP	GCGTTATTGAAACATCTTCG	48	PfCRT S220A FP	GATCTCCGCATTGATCCAC
15	PfCRT T76Q RP	CTCTTGGCGAAGATCTTTC	49	PfCRT E271Q RP	GCAATTGTTCAAGAATGGCAAG
16	PfCRT T76Q FP	GCGTTATTGAAAGATCTTCG	50	PfCRT E271Q FP	CTTGCCATCTTGAACAATTGC
17	PfCRT T76N RP	CTCTTGGCGAAGATGTTTC	51	PfCRT N75E-K76T RP	CGAAAATCGTCTCCATGACGC
18	PfCRT T76N FP	GCGTTATTGAAAACATCTTCG	52	PfCRT N75E-K76T FP	GCGTCATGGAGCGGATTTTCG
19	PfCRT T76C RP	CTCTTGGCGAAGATGCAATTC	53	PfCRT S326N RP	CGCAAATGTTGAAGAAGGAGAAC
20	PfCRT T76C FP	GCGTTATTGAAATGCATCTTCG	54	PfCRT S326N FP	GTTCTCCTTCTTCAACATTTGCG
21	PfCRT T76S RP	CTCTTGGCGAAGATGCTTTC	55	PfCRT T356I RP	GCAATAGCAATAGCTGGACCTTG
22	PfCRT T76S FP	GCGTTATTGAAAACATCTTCG	56	PfCRT T356I FP	CAAGGTCCAGCTATTGCTATTGC
23	PfCRT T76W RP	CTCTTGGCGAAGATCCAATTC	57	PfCRT I371R RP	CTAGGTTCAAGAACACATC
24	PfCRT T76W FP	GCGTTATTGAAATGGATCTTCG	58	PfCRT I371R FP	GATGTTGTTGGTGAACCTAG
25	PfCRT T76F RP	CTCTTGGCGAAGATGAATTC	59	PfCRT E75R RP	CGAAGATGGTTCTAATAACGC
26	PfCRT T76F FP	GCGTTATTGAAATCATCTTCG	60	PfCRT E75R FP	GCGTTATTAGAACCATCTTCG
27	PfCRT T76I RP	CTCTTGGCGAAGATGATTC	61	PfCRT E75D RP	CGAAGATGGTATCAATAACGC
28	PfCRT T76I FP	GCGTTATTGAAATCATCTTCG	62	PfCRT E75D FP	GCGTTATTGATACCATCTTCG
29	PfCRT T76M RP	CTCTTGGCGAAGATCAATTC	63	PfCRT E75G RP	CGAAGATGGTTCAATAACGC
30	PfCRT T76M FP	GCGTTATTGAAATGATCTTCG	64	PfCRT E75G FP	GCGTTATTGAAACCATCTTCG
31	PfCRT T76L RP	CTCTTGGCGAAGATGAGTTC	65	SP6 -66 FP	GCTTGACATATTGTCGTTAGAACC
32	PfCRT T76L FP	GCGTTATTGAAATCATCTTCG	66	PfCRT +395 FP	CCATTTCTATGTTGGATGCC
33	PfCRT T76V RP	CTCTTGGCGAAGATGACTTC	67	PfCRT +731 FP	GATTGAACGCTATGGTTTC
34	PfCRT T76V FP	GCGTTATTGAAATGATCTTCG	68	pSP64T RP	GTAAGTTGGGTATTATGTAGC