

**Generierung *Plasmodium falciparum* - spezifischer humaner
Antikörperformate aus Epstein-Barr Virus-transformierten
B Lymphozyten semi-immuner Individuen.**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin, Diplom-Wirtschaftsbiologin

Dominika J. Maskus

aus Aachen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Rainer Fischer
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. rer. medic. Stefan Barth

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 2015

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

“Now that ain’t working - that’s the way you do it.

Let me tell you: them guys ain’t dumb.

Maybe get a blister on your little finger,

maybe get a blister on your thumb.”

“Money for Nothing”

Dire Straits

1985

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
I. Einleitung	1
I.1. Malaria	1
I.1.1 Malaria tropica	1
I.1.2. Der Lebenszyklus des <i>Plasmodium falciparum</i>	1
I.1.3. Prävention und Behandlungsstrategien	3
I.1.4. Immunität	4
I.2. Merozoitenoberflächenprotein 10	5
I.3. Apikales Membranantigen 1	7
I.4. Humane monoklonale Antikörper	9
I.5. Techniken der EBV Transformation	9
I.6. Zielsetzungen und Strategie	10
II. Material und Methoden	13
II.1. Material	13
II.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	13
II.1.2. Puffer, Lösungen und Medien	13
II.1.3. Antikörper und Enzyme	15
II.1.4. Matrices zur Reinigung von Proteinen	16
II.1.5. Kitsysteme	16
II.1.6. Oligonukleotide	17
II.1.7. Vektoren	19
II.1.8. Zelllinien	20
II.1.9. Plasmodien	21
II.1.10. Bakterienstämme	21
II.1.11. Geräte	21
II.1.12. Software	23
II.1.13. Bioinformatische Analysen	24
II.2. Methoden	25
II.2.1. Proteinchemische und immunologische Methoden	25
II.2.1.1. Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäuretest (BCA)	25
II.2.1.2. Chemische Fluoreszenzmarkierung plasmodialer Antigene	25
II.2.1.3. Reduktion und Alkylierung rekombinanter Proteine	25
II.2.1.4. SDS-PAGE	26
II.2.1.5. Western Blot	26
II.2.1.6. Dotblot	26
II.2.1.7. Durchflusszytometrie zur Sortierung antigenspezifischer B Zellen	27
II.2.1.8. ELISA	27
II.2.1.9. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)	28
II.2.1.10. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	29
II.2.1.11. Tryptischer Verdau im Gel und Massenspektrometrie	30
II.2.2. Zellkultur und Parasitenkultur	30
II.2.2.1. Kultur der Zelllinien DG-75, Jurkat, Kasumi-1, Raji, Ramos und U-937	31
II.2.2.2. Kultur von B95-8 Zellen zur Gewinnung EBV-reicher Überstände	31

II.2.2.3. Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMCs)	31
II.2.2.4. Epstein-Barr Virus Transformation humaner peripherer B Zellen	32
Untersuchung der Parameter der EBV Transformation	32
EBV Transformation nach FRAUSSEN <i>et al.</i> (2010)	33
II.2.2.5. Kultur und Expansion lymphoblastoider Zellen	33
II.2.2.6. Kryokonservierung lymphoblastoider Zellen	34
II.2.2.7. Kultur von <i>Plasmodium falciparum</i>	34
II.2.2.8. Kryokonservierung und Auftauen von <i>Plasmodium falciparum</i>	34
II.2.2.9. Präparation humaner Erythrozyten für die Parasitenkultur	34
II.2.2.10. Giemsa-Färbung	34
II.2.2.11. Wachstumsinhibitionstests mit Plasmodien	34
II.2.3. Molekularbiologische Methoden	36
II.2.3.1. Gewinnung von mRNS und genomischer DNS	36
II.2.3.2. Reverse Transkription der mRNS	36
II.2.3.3. PCRs zur Sicherung der variablen Immunglobulinsequenzen humaner lymphoblastoider Zellen	36
II.2.3.4. Klonierung der variablen Bereiche humaner Antikörper	37
Klonierung in kommerzielle TopoVektoren	37
Klonierung in pTRAkt-Expressionsvektoren	38
II.2.3.5. Analyse der Klonalität lymphoblastoider Zellreihen mittels Spektratyping	38
II.2.3.6. Mutagenese der variablen Bereiche humaner Antikörper	38
II.2.4. Mikrobiologische Methoden	39
II.2.4.1. Bereitung elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i>	39
II.2.4.2. Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	39
II.2.4.3. Kultur von <i>A. tumefaciens</i>	39
II.2.4.4. Kryokonservierung von <i>A. tumefaciens</i>	39
II.2.5. Expression humaner Antikörper in <i>N. benthamiana</i>	39
II.2.5.1. Infiltration und transiente Transfektion von <i>N. benthamiana</i>	39
II.2.5.2. Kultur und Ernte der infiltrierten Pflanzen	40
II.2.5.3. Reinigung humaner Antikörper aus Zellkulturüberständen und aus <i>N. benthamiana</i>	40
II.2.5.4. Analytische Gelfiltration	41
II.2.6. Expression und Reinigung rekombinanter plasmodialer Antigene	41
III. Ergebnisse	42
III.1. EBV Transformation	42
III.1.1. Optimierung der EBV Transformation	42
III.1.2. EBV Transformation von B Lymphozyten semi-immuner Spender	44
III.1.3. Effizienz der modifizierten EBV Transformation nach FRAUSSEN <i>et al.</i> (2010)	45
III.2. Untersuchung der Klonalität lymphoblastoider Zellkulturen	45
III.3. Sicherung der variablen Bereiche der humanen Antikörper aus lymphoblastoiden Zellreihen	46
III.4. Testexpression und Identifikation anti-plasmodialer humaner Antikörper	47

III.5. Vergleich der affinitätsgereiften Antikörper mit ihren nicht mutierten Vorläufern	49
III.6. Expression und Reinigung humaner Antikörper	51
III.7. ELISA und Dotblots	53
III.7.1. ELISA und Dotblots zur Spezifitätsbestimmung der humanen monoklonalen Antikörper	53
III.7.2. Reaktivität ghanaischer Seren mit MSP10 und AMA1	55
III.8. Immunfluoreszenzmikroskopie	57
III.9. Oberflächenplasmonresonanzmessungen	58
III.9.1. Affinitäten natürlich und rekombinant exprimierter humaner Antikörper	58
III.9.2. Kompetitionsmessungen	60
III.10. Wachstumsinhibitionstests	62
III.10.1. Inhibition durch MSP10-spezifische Antikörper humAb10.1, 10.2 und 10.3.	62
III.10.2. Inhibition durch humAbAMA1	63
III.10.3. Synergismusuntersuchungen	65
III.11. Vergleich der AMA1-Sequenzen	66
IV. Diskussion	67
IV.1. EBV Transformation	67
IV.1.1. Optimierung der EBV Transformation	67
IV.1.1.1. Medien, CpG ODN 2006 und holo-Transferrin	67
IV.1.1.2. Versorgerzellen Kasumi-1 und DG-75	68
IV.1.2. EBV Transformation von B Lymphozyten semi-immuner Spender	69
IV.2. Untersuchung der Klonalität lymphoblastoider Zellkulturen	70
IV.3. Sicherung der variablen Bereiche der humanen Antikörper aus lymphoblastoiden Zellreihen	71
IV.4. Identifikation anti-plasmodialer humaner Antikörper und Effizienzbetrachtung	72
IV.5. Vergleich der affinitätsgereiften Antikörper mit ihren nicht mutierten Vorläufern	73
IV.6. Expression und Reinigung humaner Antikörper	75
IV.7. ELISA und Dotblots	76
IV.7.1. ELISA und Dotblots zur Spezifitätsbestimmung der humanen monoklonalen Antikörper	76
IV.7.2. Reaktivität ghanaischer Seren mit MSP10 und AMA1	77
IV.8. Immunfluoreszenzmikroskopie	78
IV.9. Affinitäten natürlich und rekombinant exprimierter humaner Antikörper	78
IV.9.1. Affinitäten der MSP10-spezifischen Antikörper	78
IV.9.2. Affinität und Spezifität des AMA1-spezifischen Antikörpers	80
IV.9.3. Kompetitionsmessungen	80
IV.10. Wachstumsinhibitionstests	81
IV.10.1. MSP10-spezifische Antikörper humAb10.1, 10.2 und 10.3	81
IV.10.1.1. Rolle des MSP10	82

IV.10.1.2. Redundanz und Präferenzen der Interaktionen während der Invasion	83
IV.10.1.3. Inhibition und Affinität	83
IV.10.1.4. Inhibition und physiologische Antikörperkonzentration	84
IV.10.2. Inhibition durch humAbAMA1	84
IV.10.2.1. Inhibition, Wirkungsspektrum und Affinität	84
IV.10.2.2. Inhibition und physiologische Antikörperkonzentration	85
IV.10.2.3. Wirkprinzip des humAbAMA1	85
IV.10.3. Synergismusuntersuchungen	87
V. Ausblick	88
V.1. MSP10-spezifische humAbs	88
V.2. HumAbAMA1	88
V.3. Weitere Funktionalitätstests	88
V.4. Aspekte des Einsatzes humaner anti-plasmodialer Antikörper als passive Vakzine	89
V.4.1. Wirksamkeit	89
V.4.2. Kreuzreaktivität	89
VI. Zusammenfassung	90
VII. Bibliographie	92
VIII. Anhang	v
VIII.1. Anmerkungen	v
VIII.2. Transkriptionslevel von AMA1, MSP1 und MSP10	xi
VIII.3. Oligonukleotide	xii
VIII.4. Gesicherte variable Bereiche humaner Antikörper	xv
VIII.5. Vergleich der affinitätsgereiften Antikörper mit ihren nicht mutierten Vorläufern: zusätzliche Information der kodierenden Sequenzen	xviii
VIII.6. Interaktionen und Invasionswege	xxi
VIII.7. Abkürzungen	xxii
IX. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	xxvii
IX.1. Tabellen	xxvii
IX.2. Abbildungen	xxviii
Veröffentlichungen und Patente	xxx
Lebenslauf	xxxii
Danksagung	xxxii
Eidesstattliche Erklärung	xxxiv

I. Einleitung

I.1. Malaria

Malaria ist eine Krankheit, welche in 97 Staaten der Erde endemisch ist (WHO, 2013) und welche die Menschheit seit Anbeginn ihrer Existenz begleiten dürfte (COX, 2002).¹ Mit 3,4 Milliarden Menschen ist nahezu die Hälfte der Weltbevölkerung dem Risiko ausgesetzt sich mit Plasmodien zu infizieren und folglich an Malaria zu erkranken. Im Jahr 2012 litten 135-287 Millionen Menschen an dieser Krankheit; 473.000 bis 789.000 Menschen starben daran (WHO, 2013). Der überwiegende Anteil dieser Todesopfer sind Kinder von unter fünf Jahren (ELLIOTT und BEESON, 2008).

Hervorgerufen wird Malaria durch Plasmodien, Protozoen des Stammes der Apicomplexa. Die fünf humanpathogenen Spezies *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*,² *P. malariae* und *P. knowlesi*, können jeweils unterschiedliche, charakteristische Krankheitsbilder hervorrufen (GREENWOOD *et al.*, 2008; RICHARDS und BEESON, 2009).³

I.1.1. Malaria tropica

Malaria tropica, verursacht durch *P. falciparum*, ist die häufigste und gravierendste Form der Malaria (RAMASAMY, 1998). Neben unregelmäßigem oder kontinuierlichem Fieber gehen unkomplizierte Krankheitsverläufe dieser Malariaform häufig mit Muskelschmerzen, Atemnot, Kopfschmerzen, Übelkeit und Krämpfen einher (GRAVES und GELBAND, 2006a), während komplizierte Verläufe außerdem geprägt sein können von Ikterus (Gelbsucht), schwerer Anämie sowie Nieren- und Leberversagen (RAMASAMY, 1998; TUTEJA, 2007). Eine weitere, gefährliche Komplikation stellt die zerebrale Malaria dar, die die Gefahr eines lebensbedrohlichen Komas birgt (STACE *et al.*, 1982; MOLYNEUX *et al.*, 1989; BATISTA *et al.*, 2009).

I.1.2. Der Lebenszyklus des *Plasmodium falciparum*

P. falciparum benötigt für seinen Lebenszyklus zwei Wirte, weibliche Anophelesmücken und den Menschen. Der Abschnitt im Menschen beginnt mit der Injektion von Sporozoiten aus den Speicheldrüsen einer Anophelesmücke in die menschliche Haut (SIDJANSKI und VANDERBERG, 1997; MATSUOKA *et al.*, 2002). Sobald die Sporozoiten in den Blutstrom und über ihn zur Leber gelangen, passieren sie Kupffer-Zellen, penetrieren Hepatozyten und entwickeln sich in ebendiesen binnen 9 bis 16 Tagen zu Merozoiten (FREVERT *et al.*, 2006; TUTEJA, 2007). In diesem Teil des Lebenszyklus, der exoerythrozytären Schizogonie, werden in Hepatozyten zehntausende Merozoiten gebildet, die in membranumhüllten Vesikeln, sog. Merosomen, aus der Leber in den Blutstrom gelangen (STURM *et al.*, 2006). Die aus den Merosomen freigesetzten Merozoiten infizieren schließlich rote Blutkörperchen. Damit beginnen mit der erythrozytären Schizogonie weitere Runden der asexuellen Vermehrung. Innerhalb von zwei Tagen entwickeln sich die Merozoiten in den roten Blutkörperchen über das Ringstadium und Trophozoiten zu Schizonten, die wiederum je bis

zu 20 Merozoiten freisetzen können (MILLER *et al.*, 2002; TUTEJA, 2007). Einige Merozoiten entwickeln sich zu männlichen Mikro- oder weiblichen Makrogametozyten, die wiederum von einer Anophelesmücke aufgenommen werden können (GREENWOOD *et al.*, 2008). In der Mücke schließt sich der Kreis; hier werden über verschiedene sexuelle Entwicklungsstadien neue infektiöse Sporozoiten gebildet (RAMASAMY, 1998; TUTEJA, 2007). Die Abbildung 1 fasst die einzelnen Schritte des Lebenszyklus schematisch zusammen.

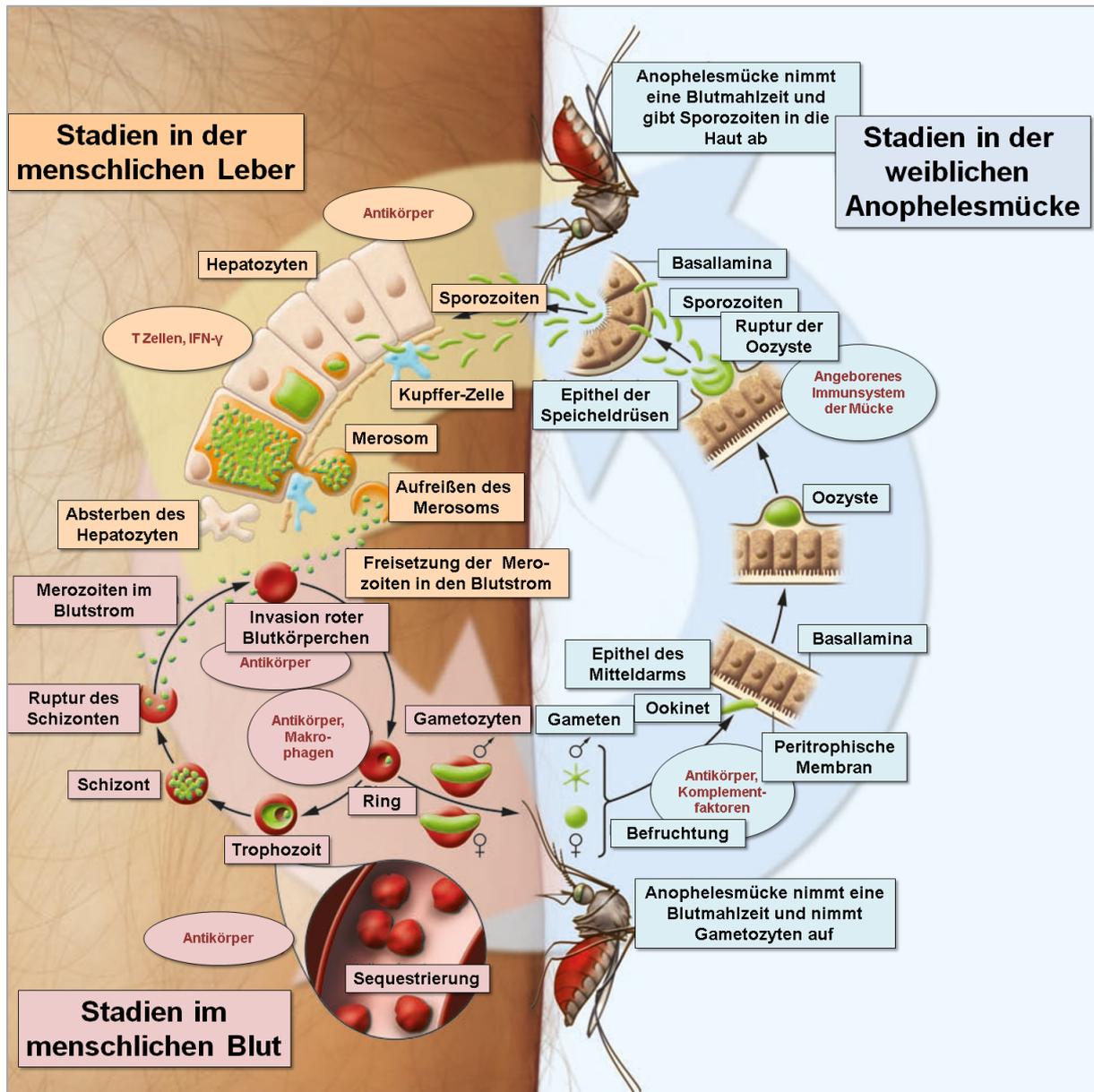


Abbildung 1: Schema des Lebenszyklus des *Plasmodium falciparum* in Menschen (links) und weiblichen Anophelesmücken (rechts). Nach der Injektion von Sporozoiten aus den Speicheldrüsen einer infizierten Anophelesmücke in die menschliche Haut beginnt der Lebensabschnitt der Plasmodien im humanen Wirt. Es folgen die exoerythrozytäre Schizogonie in der Leber und die Stadien im menschlichen Blutstrom. Einige der im Blut gebildeten Merozoiten entwickeln sich zu Gametozyten, die wiederum durch eine Mücke aufgenommen werden können, um sich in ihnen zu infektiösen Sporozoiten zu entwickeln. Darstellung in Anlehnung an GREENWOOD *et al.* (2008), Abbildung 1.

Im Gegensatz zu den Blutstadien sind die Leberstadien nicht von klinischen Symptomen begleitet (GREENWOOD *et al.*, 2008). In der erythrozytären Phase stimulieren bspw. die GPI-Anker plasmodialer Proteine, die insb. durch das Aufreißen infizierter roter Blutkörperchen in den Blutstrom gelangen, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktoren (TNF α und TNF β) und Interleukin-1, durch Makrophagen, aktivierte T_{H1} Zellen und Fibroblasten (CLARK, 1978; KARUNAWEERA *et al.*, 1992; KWIATKOWSKI *et al.*, 1993; SCHOFIELD und HACKETT, 1993; RAMASAMY, 1998). Interleukin-1 verursacht das für Malaria charakteristische Fieber und die Ausschüttung von Interleukin-6 und Akutphaseproteinen (RAMASAMY, 1998). Das induzierte Fieber kann einen direkten negativen Effekt auf die Parasitenproliferation haben (KWIATKOWSKI, 1989; BRANDTS *et al.*, 1997; LONG *et al.*, 2001; BOYLE *et al.*, 2013a). Darüberhinaus sorgt das freigesetzte TNF durch die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten/Makrophagen für eine verbesserte, zellulär vermittelte Abwehr, z.B. durch die Phagozytose und das Abtöten von Blut- und Leberstadien (KWIATKOWSKI, 1989; KUMARATILAKE *et al.*, 1990, 1996; NÜSSLER *et al.*, 1991; RAMASAMY, 1998).

I.1.3. Prävention und Behandlungsstrategien

Die Kontrolle der Übertragung der Malariaerreger durch die Anophelesmücken erfolgt weitgehend mit Insektiziden, bspw. durch deren Versprühen in Innenräumen (IRS, „indoor residual spraying“) und ihre Nutzung zur Imprägnierung von Mückennetzen (ITN, „insecticide-treated nets“) (WHO, 2012). Zur Prophylaxe und Behandlung plasmodialer Infektionen werden hauptsächlich Kombinationen von Chemotherapeutika verabreicht, wie es z.B. die Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT) vorsieht. Eine Variante der Malariaprävention ist die intermittierende präventive Behandlung, die man in drei Strategien aufteilt: IPTi, IPTc und IPTp („intermittent preventive treatment in infants“ (Kinder jünger als zwei Jahre), „in children“ (zwei bis zehn Jahre) und „during pregnancy“). Diese Strategien konnten zum Teil große Erfolge verzeichnen (MENÉNDEZ *et al.*, 2010; RAMHARTER *et al.*, 2007).

Allerdings ist die Vektorkontrolle und die Behandlung mit Chemotherapeutika keine nachhaltige Strategie zur Bekämpfung der Malaria, da sich sowohl bei Anophelesmücken als auch bei Plasmodien viele Resistenzen entwickelt haben, so z.B. gegen Chloroquin, Artemisinin oder Mefloquin (WELLEMS und PLOWE, 2001; NOSTEN *et al.*, 1991; DONDORP *et al.*, 2009). Außerdem ist zu erwarten, dass sich mit dem Einsatz neuer Wirkstoffe zunehmend weitere Resistenzen entwickeln werden.

Die beste und nachhaltigste Kontrolle infektiöser Erkrankungen versprechen jedoch Vakzine, da diese (1) das Potential bergen, einen langfristigeren Schutz zu verleihen und (2) nicht von der Verfügbarkeit und Verabreichung von Chemotherapeutika abhängen. Das *finis bonorum* eines Malariavakzins, das die Impflinge mehrere Jahre oder gar ihr ganzes Leben lang schützt, wurde bisher nicht erreicht. Der in der klinischen Entwicklung am weitesten Fortgeschrittene, RTS,S / AS01 von GlaxoSmithKline, befindet sich in der klinischen Phase 3. Der Schutz vor einer Malaria durch diesen Impfstoff liegt jedoch lediglich bei 27-56%

(AGNANDJI *et al.*, 2011; WHITE *et al.*, 2014; RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, 2012; 2014), daher ist eine Entwicklung weiterer Impfstoffkandidaten unverzichtbar. Dazu zählen z.B. rekombinante Proteine, synthetische Peptide verschiedenster Antigene, DNS, inaktivierte, intakte Parasiten und Kombinationen von Antigenen (GRAVES und GELBAND, 2006a; 2006b; 2006c).

I.1.4. Immunität

Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Formen der Immunität gegen Malaria; die sterile Immunität, die die Manifestation der Infektion vollständig verhindert und die Immunität gegen die klinische Erkrankung, bei der zwar eine gewisse Parasitämie vorhanden ist, es jedoch nicht zu einer Symptomatik kommt (DOOLAN, 2011). Die sterile Immunität scheint vor allem von der CD8⁺ T Zellantwort abhängig zu sein, was durch das Modell der Sporozitenimmunisierung gezeigt werden konnte (CLYDE, 1975). Diese Form der Immunität richtet sich nur gegen die Sporoziten- und Leberstadien (HOFFMANN und FRANKE, 1994; DOOLAN und MARTINEZ-ALIER, 2006). Allerdings kommt diese Form des Schutzes nicht in der exponierten Bevölkerung vor, sondern ist nur bei artifiziell hohen Sporozitenexpositionen in experimentellen Situationen darstellbar. Ob diese Vakzinierungsstrategie, wie sie mit dem Impfstoffkandidaten PfSPZ (Sanaria) angestrebt wird, tatsächlich für eine flächendeckende Verabreichung tauglich ist und sich diese logistisch und finanziell umsetzen lässt, bleibt zu klären (vgl. HOFFMAN *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zur sterilen Immunität äußert sich die natürlich vorkommende, sog. Präimmunität oder Semi-Immunität unter anderem darin, dass exponierte Individuen trotz eines breiten Spektrums protektiver Antikörper (1) Parasiten im Blut aufweisen können ohne klinische Manifestationen zu zeigen und (2) selbst nach jahrelanger klinischer Asymptomatik, erneut klinische Phasen der Malaria durchlaufen können (SERGENT und PARROT, 1935; GUPTA *et al.*, 1999; MARSH und KINYANJUI, 2006; CROMPTON *et al.*, 2008). Die Gefahr des Ausbruchs einer Malaria steigt, wenn keine ständigen Neuinfektionen stattfinden (DAY und MARSH, 1991; DZIKOWSKI und DEITSCH, 2009; RAMASAMY, 1998; LANGHORNE *et al.*, 2008). Diese Semi-Immunität bezieht sich hauptsächlich auf die erythrozytären Stadien. Spektren und Titer protektiver Antikörper richten sich dabei vornehmlich gegen Antigene, die im Merozoitenstadium exprimiert werden (OSIER *et al.*, 2008), wobei die Wirkmechanismen dieser Antikörper auf (1) der Blockierung der Reinvasion der Merozoiten in die Erythrozyten, (2) der Agglutination von Merozoiten, (3) der durch Komplementfaktoren bedingten Lyse ebendieser und anderer Blutstadien und/ oder (4) der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen beruhen können (RAMASAMY und RAJAKARUNA, 1997; KUMARATILAKE *et al.*, 1996; MILLER *et al.*, 1984; LYON *et al.*, 1986; RAMASAMY *et al.*, 1990; BLACKMAN *et al.*, 1990; GROUX und GYSIN, 1990; BOUHAROUN-TAYOUN *et al.*, 1995; JAFARSHAD *et al.*, 2007).

Dass dieser antikörpervermittelte Immunschutz übertragbar ist, konnte bereits in den 1960er Jahren gezeigt werden. Diese Studien zeigten, dass an Malaria erkrankte Kinder oder Erwachsene, die mit gereinigten γ -Globulinfraktionen aus Serum hyperimmuner, adulter

afrikanischer Spender behandelt wurden, nach spätestens vier Tagen eine drastische Reduktion der Parasitämie zeigten, womit i.d.R. gleichzeitig ein Abfall des Fiebers und eine Besserung der Krankheitssymptome einhergingen (COHEN *et al.*, 1961; EDOZIEN *et al.*, 1962; MCGREGOR *et al.*, 1963; SABCHAREON *et al.*, 1991). Allerdings werden passive Vakzinierungsstrategien zur Prophylaxe und Therapie plasmodialer Infektionen bisher nicht verfolgt oder angestrebt.

I.2. Merozoitenoberflächenprotein 10

Das Merozoitenoberflächenprotein 10 (MSP10) wurde erstmals von BLACK *et al.* (2003) beschrieben. Unter der Annahme, dass es mehr als die zwei *P. falciparum*-Proteine MSP1 und MSP8 geben müsse, die ein doppeltes Faltungsmotiv des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) tragen, durchsuchten sie die EST-Datenbank des „Malaria Genome Sequencing Project“ nach geeigneten Sequenzen und wurden fündig. *PfMSP10* trägt in seiner nicht prozessierten Form 524 Aminosäurereste, von denen die N-terminalen und C-terminalen jeweils einen hydrophoben Bereich bilden. Abbildung 2 stellt den Aufbau des Proteins schematisch dar. Am C-Terminus befinden sich außerdem ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker und das doppelte EGF-Motiv, das durch eine sehr kompakte, gedrungene Faltung und sechs Disulfidbrücken gekennzeichnet ist.

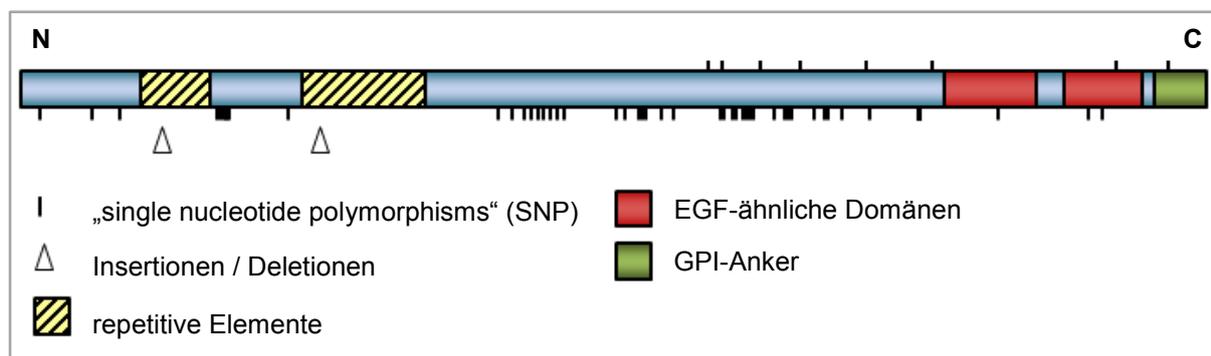


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *PfMSP10* in Anlehnung an TETTEH *et al.* (2009). Dargestellt sind einzelne Nukleotidunterschiede und Insertionen / Deletionen basierend auf der Analyse von Sequenzen aus 14 gambischen Patientenisolaten. Die Lage der EGF-ähnlichen Strukturmodule ist in Rot veranschaulicht. ‚N‘: Aminoterminus; ‚C‘: Carboxyterminus. Quelle: TETTEH *et al.* (2009), modifiziert.

In Abbildung 3 sind die Modelle der Strukturen der EGF-Motive des *PfMSP1* (*PfMSP1*₁₉) und des *PbMSP8* veranschaulicht; in der Abbildung 4 finden sich Vergleiche der Aminosäuresequenzen und Sekundärstrukturen des Strukturmotivs von *PfMSP1* mit *PfMSP8* und *PfMSP10*. Charakteristisch für dieses Faltungsmuster bei diesen drei Proteinen ist außerdem ein asparagin- und glycinreicher Abschnitt am Anfang des zweiten EGF-Motivs. Das *PfMSP10*-Gen (MAL6P1.221) wird während der asexuellen Blutstadien transkribiert (BOZDECH *et al.*, 2003)⁴ und das entsprechende Protein exprimiert (BLACK *et al.*, 2003). Die höchsten mRNS-Konzentrationen und höchsten Proteinmengen findet man 30 bis 47 Stunden nach der Invasion der roten Blutkörperchen vor (BLACK *et al.*, 2003, Abbildung 3). Dies entspricht späten Trophozoiten- bzw. Schizontenstadien.

BLACK *et al.* (2003) fanden außerdem, dass das *PfMSP10* ab ca. 33 Stunden nach der Infektion der Erythrozyten proteolytisch prozessiert wird. Neben dem 80 kDa großen, intakten Protein findet man nun auch ein 36 kDa großes Fragment vor (BLACK *et al.*, 2003, Abbildung 3). Diese Prozessierung, die strukturelle Ähnlichkeit der EGF-Motive und die Tatsache, dass *PfMSP1* und *PfMSP10* den glycin- und asparaginreichen Bereich gemein haben, lassen vermuten, dass diese Proteine zumindest in Bezug auf das EGF-Motiv eine paraloge Funktionsweise haben könnten. Der glycin- und asparaginreiche Abschnitt des EGF-Motivs des *PfMSP1* bildet eine 3_{10} -Helix und ist Teil einer konservierten, oberflächenexponierten Tasche (DREW *et al.*, 2004; siehe hierzu auch Abbildungen 3 und 4).

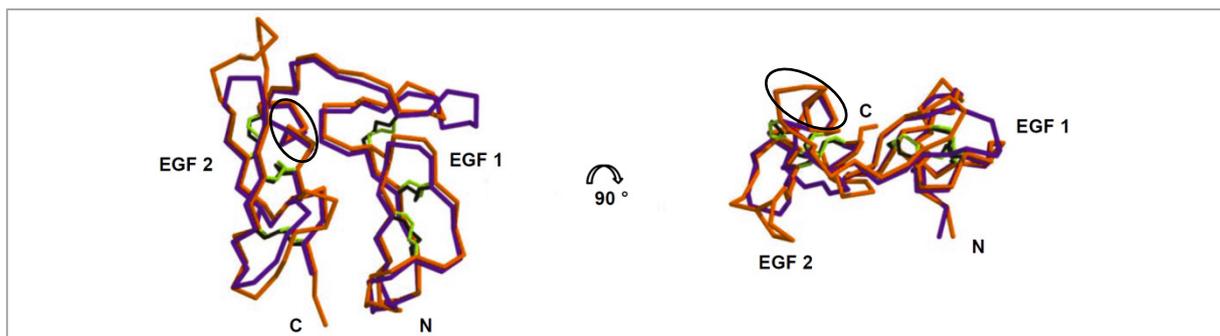


Abbildung 3: Modell der Strukturen der EGF-Motive des *P. falciparum* MSP1 und des *P. berghei* MSP8 in Anlehnung an DREW *et al.* (2004). Das Peptidrückgrat der EGF-Motive des MSP1 (orange) entspricht der Struktur, die von PIZARRO *et al.* (2003) röntgendiffraktometrisch bestimmt wurde (<http://www.rcsb.org/pdb>, Identifier 1OB1). DREW und Kollegen modellierten basierend hierauf die Struktur der EGF-Domänen des MSP8 (violett). Disulfidbrücken sind grün bzw. schwarz dargestellt. Die Lage des asparagin- und glycinreichen Abschnitts ist mit Ovalen visualisiert. ‚N‘: Aminoterminus; ‚C‘: Carboxyterminus. Quelle: DREW *et al.* (2004), modifiziert.

PfMSP1₁₉ wurde außerdem als derjenige Teil des *PfMSP1* identifiziert, der zusammen mit *PfMSP9* mit dem Protein Bande 3 (auch: Anionenaustauscher 1, AE1) humaner Blutkörperchen interagiert und dieses als Rezeptor nutzt (GOEL *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004; KARIUKI *et al.*, 2005). Ob der glycin- und asparaginreiche Abschnitt hierbei eine Rolle spielt und auch *PfMSP8* und *PfMSP10* dazu befähigt diesen Rezeptor zu binden, ist noch nicht geklärt. Für eine Funktion des *PfMSP10* in der Adhäsion an / in der Invasion in Erythrozyten sprechen die Ergebnisse von PUENTES *et al.* (2005). Diese Gruppe testete synthetische Icosapeptide des *PfMSP10* hinsichtlich ihrer Fähigkeit an humane Erythrozyten zu binden und das Parasitenwachstum *in vitro* zu hemmen. Drei der 27 Peptide, von denen eines einem Bereich des ersten EGF-Motivs entsprach (Peptid 31132), zeigten solche Eigenschaften. Peptid 31132 zeigte dabei eine Inhibition der Parasiten von 65% ($\pm 2\%$) bei einer Konzentration von 200 μM (0,46 mg/mL). Ein Peptid derselben Länge und derselben Aminosäurezusammensetzung mit randomisierter Aminosäureabfolge („scrambled peptide“) zeigte nicht dieselben Bindungs- und Inhibitionseigenschaften wie Peptid 31132 (PUENTES *et al.*, 2005).

Ein weiteres Indiz dafür, dass *PfMSP10* eine kritische Funktion zukommen könnte, ist, dass sich im Serum malariaexponierter Spender Antikörper nachweisen lassen, die insbesondere die EGF-Motive des *PfMSP10* erkennen (BLACK *et al.*, 2003, Abbildung 6).

Diese Tatsache und der Umstand, dass das doppelte EGF-Motiv des *PfMSP10* bei den bisher analysierten *P. falciparum*-Stämmen sehr konserviert ist (siehe Abbildung 2), sprechen dafür, dass es als Komponente eines aktiven Vakzins geeignet sein könnte (PUENTES *et al.*, 2005) oder als Zielstruktur eines passiven Impfstoffs, bspw. in Form eines protektiven Antikörpercocktails. Bisher wurden noch keinerlei MSP10-spezifische monoklonale Antikörper isoliert – weder aus Nagetieren noch aus Menschen. Monoklonale Antikörper wären sehr wertvoll für die nähere Untersuchung der Funktionsweise und der Interaktionspartner des MSP10.

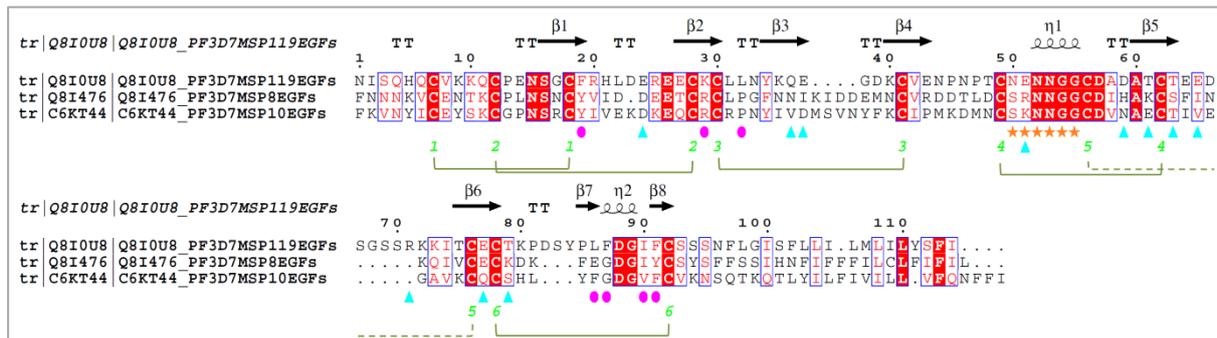


Abbildung 4: Alignment der doppelten EGF-Motive des MSP1, des MSP8 und des MSP10 aus *P. falciparum* 3D7. Cysteinreste, die an Disulfidbrücken beteiligt sind, sind grün nummeriert; zusammengehörige sind verbunden. Aminosäurereste, die an Kontakten zwischen den EGF-Motiven des MSP1₁₉ beteiligt sind (DREW *et al.*, 2004), sind mit violetten Ovalen markiert. Reste des MSP1, die der umgebenden Lösung zugänglich sind (DREW *et al.*, 2004), sind mit Dreiecken gekennzeichnet. Der asparagin- und glycinreiche Abschnitt am Anfang des zweiten EGF-Motivs des *PfMSP1* (Sterne) findet sich auch bei *PfMSP8* und *PfMSP10* wieder. Die Sekundärstrukturinformation (PDB Eintrag 1OB1 (Kette C)) wurde mithilfe der Werkzeuge auf <http://esript.ibcp.fr> auf das Alignment von *PfMSP1*, *PfMSP8* und *PfMSP10* übertragen. T: Turns; β : β -Stränge; η : 3_{10} -Helices. Die Sequenzen wurden bezogen von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> (Q8I0U8, Q8I476 und C6KT44). Entsprechende C-terminale Abschnitte wurden mithilfe des Clustal Omega Werkzeugs verglichen (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>).

I.3. Apikales Membranantigen 1

Das Apikale Membranantigen 1 (AMA1) wurde 1982 erstmals beschrieben (DEANS *et al.*, 1982). Ähnlich wie MSP10 wird AMA1 hauptsächlich in den späteren erythrozytären Stadien exprimiert (PETERSON *et al.*, 1989; NARUM und THOMAS, 1994). Im Gegensatz zur MSP10 wird AMA1 außerdem auch in Sporoziten exprimiert (SILVIE *et al.*, 2004), der Fokus soll hier jedoch auf den asexuellen Blutstadien liegen. AMA1 liegt zunächst als 83 kDa-Vorläuferprotein vor, welches in den Mikronemen lokalisiert ist (DONAHUE *et al.*, 2000; HEALER *et al.*, 2002) und zum Zeitpunkt der Freisetzung der neuen Merozoiten prozessiert wird, sodass ein – immer noch membrangebundenes – 66 kDa großes Fragment entsteht (NARUM und THOMAS, 1994; HOWELL *et al.*, 2001). Dieses AMA1₆₆ transloziert schließlich an die Merozoitenoberfläche (NARUM und THOMAS, 1994; HEALER *et al.*, 2002), um dort am apikalen Ende seine Funktion bei der Invasion eines neuen roten Blutkörperchens zu erfüllen. Hierzu interagiert es mit RON2, einem sehr konservierten, plasmodialen Protein, welches vor der Invasion aus den Rhoptrien des Merozoiten

ausgeschüttet wird und sich in die Erythrozytenmembran einlagert (BESTEIRO *et al.*, 2009; TONKIN *et al.*, 2011; LAMARQUE *et al.*, 2011). Der Kontakt zwischen AMA1 und RON2 wird vermittelt durch eine außerhalb der Erythrozytenmembran liegende hydrophobe Helix des RON2 und eine konservierte hydrophobe Bindungstasche des AMA1 (BAI *et al.*, 2005; PIZARRO *et al.*, 2005; TONKIN *et al.*, 2011). Dies ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Die Bildung des AMA1:RON2-Komplexes ist insofern kritisch für die Invasion als er einen Teil der „Moving Junction“ darstellt (AIKAWA *et al.* 1978; LAMARQUE *et al.*, 2011) und als Anker des Aktin-Myosin-Motors fungiert, welcher den Merozoit aktiv in das rote Blutkörperchen zieht (BAUM *et al.*, 2006; JEWETT und SIBLEY, 2003; SRINIVASAN *et al.*, 2011).

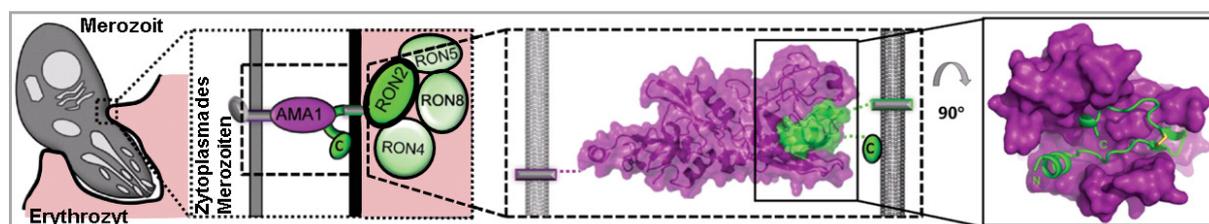


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion von AMA1 und RON2 bei der Invasion eines Merozoiten in ein rotes Blutkörperchen. AMA1 wird zum Zeitpunkt der Freisetzung junger Merozoiten aus deren Mikronemen ausgeschüttet und bleibt membrangebunden am apikalen Ende der Merozoiten. RON2, welches vor der Invasion eines roten Blutkörperchens aus den Rhoptrien des Merozoiten ausgeschüttet wird und sich in die Erythrozytenmembran einlagert, dient AMA1 als Bindungspartner. Die Interaktion wird über eine hydrophobe Bindungstasche auf Seiten des AMA1 und eine hydrophobe, außerhalb des Erythrozyten liegende Helix auf Seiten des RON2 vermittelt. Rosa: Zytoplasma des roten Blutkörperchens; violett: AMA1; sattes grün: RON2. Quelle: TONKIN *et al.* (2011), modifiziert.

Antikörper, die sich gegen AMA1 richten, können die Invasion der Merozoiten *in vitro* unterbinden (HODDER *et al.*, 2001; SILVIE, *et al.*, 2004) und die Mehrzahl der malariaexponierten Individuen weisen Antikörper auf, die spezifisch an AMA1 binden (THOMAS *et al.*, 1994; POLLEY *et al.*, 2004; CHELIMO *et al.*, 2005; CORTÉS *et al.*, 2005). Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass solche Antikörper sehr wahrscheinlich Teil des protektiven Immunglobulinrepertoires sind. Es wird angenommen, dass eine inhibitorische Wirkung AMA1-spezifischer Antikörper auf mindestens drei verschiedene Weisen herbeigeführt werden kann: (1) durch die Blockierung von Epitopen, die an der Interaktion mit anderen Proteinen, wie z.B. RON2, beteiligt sind; (2) durch die Beeinträchtigung der proteolytischen Prozessierung des AMA1; (3) durch die Störung der Umverteilung der proteolytischen Spaltprodukte (DUTTA *et al.*, 2005). Der zytoplasmatische Teil des AMA1 wird außerdem an einem Serinrest (S610) phosphoryliert; diese Modifikation hat sich als kritisch für die Invasion erwiesen (TREECK *et al.*, 2009; LEYKAUF *et al.*, 2010; SRINIVASAN *et al.*, 2011). Daher könnte eine weitere Möglichkeit der Inhibition darin bestehen, eine frühzeitige Phosphorylierung herbeizuführen – etwa durch Imitation eines natürlichen AMA1 Liganden – und eine dadurch bedingte, verfrühte Auslösung von Ereignissen, die für die Invasion essentiell sind.

Bisher wurden noch keine humanen monoklonalen Antikörper isoliert und beschrieben, die AMA1 erkennen. Es gibt jedoch einige AMA1-spezifische Antikörper aus

Nagetieren. Zwei hiervon, mAb1F9 und mAb4G2, sind sehr gut untersucht; sie wirken inhibitorisch, indem sie die Ausbildung des AMA1:RON2-Komplexes unterbinden (COLEY *et al.*, 2006; 2007; COLLINS *et al.*, 2007; 2009). Es wäre interessant zu sehen, ob humAbs, die sich gegen AMA1 richten, ähnlich wirken und ob diese eine stammabhängige Inhibition zeigen. Des Weiteren könnten solche Antikörper als passives Vakzin geeignet sein, welches seine Wirkung nicht nur auf der Ebene der erythrozytären Stadien entfalten könnte, sondern bereits auf der Ebene der Etablierung der Leberstadien. Denn AMA1 ist nicht nur für die Invasion von Merozoiten in rote Blutkörperchen essentiell, sondern wird auch in Sporozoiten exprimiert, die Hepatozyten infizieren (SILVIE *et al.*, 2004).

I.4. Humane monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper des authentischen humanen Immunglobulinrepertoires sind in vielerlei Hinsicht von besonderem Wert sowohl für die Grundlagenforschung und die angewandte Forschung als auch für die Anwendung als Diagnostika, Prophylaktika und Therapeutika. Humane monoklonale Antikörper (humAbs) gewähren Einblicke in die natürliche Entwicklung und die Wirkmechanismen humoraler adaptiver Immunität – gegen Pathogene oder entartete, körpereigene Zellen – oder Autoimmunität und können somit richtungsweisend sein z.B. für die Entwicklung aktiver und passiver Impfstoffe und zielgerichteter Antikörper-Wirkstoff-Konjugate („Antibody-Drug Conjugate“, ADC).

Es liegt auf der Hand, dass es ethisch und moralisch nicht vertretbar ist, Menschen zu diesen Zwecken zu infizieren oder eine Autoimmunantwort zu provozieren, um ihr B Zellrepertoire nutzbar zu machen. Daher ist auf B Lymphozyten solcher Individuen zurückzugreifen, die eine entsprechende immunologische Vorgeschichte aufweisen.⁵ Zu den Methoden zur Gewinnung authentischer humAbs aus humanen B Zellen zählen vor allem Phagendisplaytechniken (ENGBERG *et al.*, 1995; ADAMS und SCHIER, 1999; ZHANG *et al.*, 2003), Einzelzell-PCR (TILLER *et al.*, 2008) und Epstein-Barr Virus (EBV) Transformationstechniken (TRAGGIAI *et al.*, 2004; SIMMONS *et al.*, 2007; SIMONELLI *et al.*, 2013).

I.5. Techniken der EBV Transformation

Lange Zeit fand die Technik der Epstein-Barr Virus Transformation⁶ keine Anwendung zur Erzeugung humaner (monoklonaler) Antikörper, sondern diente Studien humaner Histokompatibilitätskomplexe (JONES *et al.*, 1975; LANTZ *et al.*, 1991; BASS *et al.*, 2004), der Untersuchung des onkogenen Potentials dieses Herpesvirus (HUMME *et al.*, 2003) oder der Generierung großer Mengen hochmolekularer menschlicher DNS (AMOLI *et al.*, 2009). STEINITZ *et al.* erzeugten 1977 erstmals lymphoblastoide Zellreihen, die humane anti-Hapten-Antikörper sezernierten (STEINITZ *et al.*, 1997). Seitdem wurden die Techniken weiter verfeinert und optimiert. Zwar lassen sich sogenannte lymphoblastoide Zellen (LCLs) spontan erzeugen, wenn etwa periphere B Lymphozyten eines EBV-seropositiven Spenders in Kultur genommen werden (YAMAMOTO *et al.*, 1981; LEWIN *et al.*, 1987; AVILA-

CARIÑO *et al.*, 1997). Man nutzt heute jedoch meist EBV, das mithilfe einer Zelllinie aus Marmosettaffen, B95-8, hergestellt wird (MILLER *et al.*, 1972; MILLER und LIPMAN, 1973) und setzt der Kultur weitere Zusätze, wie etwa Cyclosporin A oder L-Leucyl-L-leucin-O-methylester, hinzu, sofern zytotoxische T Zellen zu inhibieren sind (THORLEY-LAWSON *et al.*, 1977; TOSATO *et al.*, 1982; OHLIN *et al.*, 1992; ICHIKAWA *et al.*, 1999). Weitere Additive können bspw. CpG ODN 2006 oder R-848 (TLR9- bzw. TLR7/8-Liganden) sein, die einen positiven Effekt auf die B Zellaktivierung und -proliferation haben (TOMAI *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2007; PINNA *et al.*, 2009; TRAGGIAI *et al.*, 2004; FRAUSSEN *et al.*, 2010). Des Weiteren besteht die Möglichkeit entweder (1) die gesamte mononukleäre Leukozytenpopulation des peripheren Blutes, d.h. PBMCs, die T Zellen, B Zellen, Monozyten und einige NK Zellen enthalten, einzusetzen und mit EBV zu behandeln oder (2) nur eine bestimmte B Zellpopulation der PBMCs, die man mittels Durchflusszytometrie oder magnetischer Zellseparation angereichert hat, mit EBV zu infizieren. Im letzten Fall bietet es sich an, die B Lymphozyten auf bestrahlten Versorgerzellen zu betten und zu transformieren, wie z.B. auf murinen Monozyten-/ Makrophagenzellen (J-774A.1) (vgl. HWANG *et al.*, 2012), humanen embryonalen Fibroblasten (vgl. DIRMEIER *et al.*, 2003) oder humanen PBMCs (vgl. TRAGGIAI *et al.*, 2004; FRAUSSEN *et al.*, 2010). Es wird angenommen, dass diese Zellen die Transformationseffizienz dadurch positiv beeinflussen, dass sie Zell-Zell-Kontakte vermitteln (TIEBOUT *et al.*, 1987) und lösliche, parakrin wirkende Faktoren ausschütten (DIRMEIER *et al.*, 2003). Einige Tage bis Wochen nach der Infektion können die frischen lymphoblastoiden Zellen erneut stimuliert werden, z.B. mit CpG ODN 2006 und Interleukin-2 (IL-2). Vielversprechende Zellreihen identifiziert man häufig mittels ELISA.

I.6. Zielsetzungen und Strategie

Für die Gewinnung humaner monoklonaler Antikörper aus EBV-transformierten B Zellen semi-immuner Spender gilt es, eine geeignete EBV Transformationstechnik (im weiteren Sinne) zu optimieren bzw. an die jeweils im Labor gegebenen Randbedingungen, die z.B. durch den Typ des Durchflusszytometers und andere Geräte gegeben sein können, anzupassen. Des Weiteren gilt es, die EBV Transformationstechnik effizient zu gestalten, welches dadurch erreicht werden kann, dass nicht die gesamte $IgG^+ / CD22^+$ B Zellpopulation zur Transformation eingesetzt wird, sondern lediglich der antigenspezifische Teil der $IgG^+ / CD22^+$ B Lymphozyten.⁷ Hierzu sollen rekombinant exprimierte Proteine, die plasmodiale Epitope tragen, chemisch fluoreszenzmarkiert und für die durchflusszytometrische Anreicherung der $IgG^+ / CD22^+$ B Zellen eingesetzt werden (Schritt 1, Abbildung 6). Nach der EBV Transformation im engeren Sinne (Schritt 2, Abbildung 6) gilt es, die lymphoblastoiden Kulturen mittels ELISA und Spekatyping/ Fragmentanalyse hinsichtlich der Sekretion anti-plasmodialer Antikörper bzw. des Grades der Klonalität zu untersuchen (Schritt 3, Abbildung 6). Diese Informationen sind maßgeblich dafür, welche Kulturen zur molekularbiologischen Sicherung der variablen Bereiche der Immunglobuline verwendet werden und mit welchem Arbeitseinsatz diese Sicherung zu betreiben ist.⁸

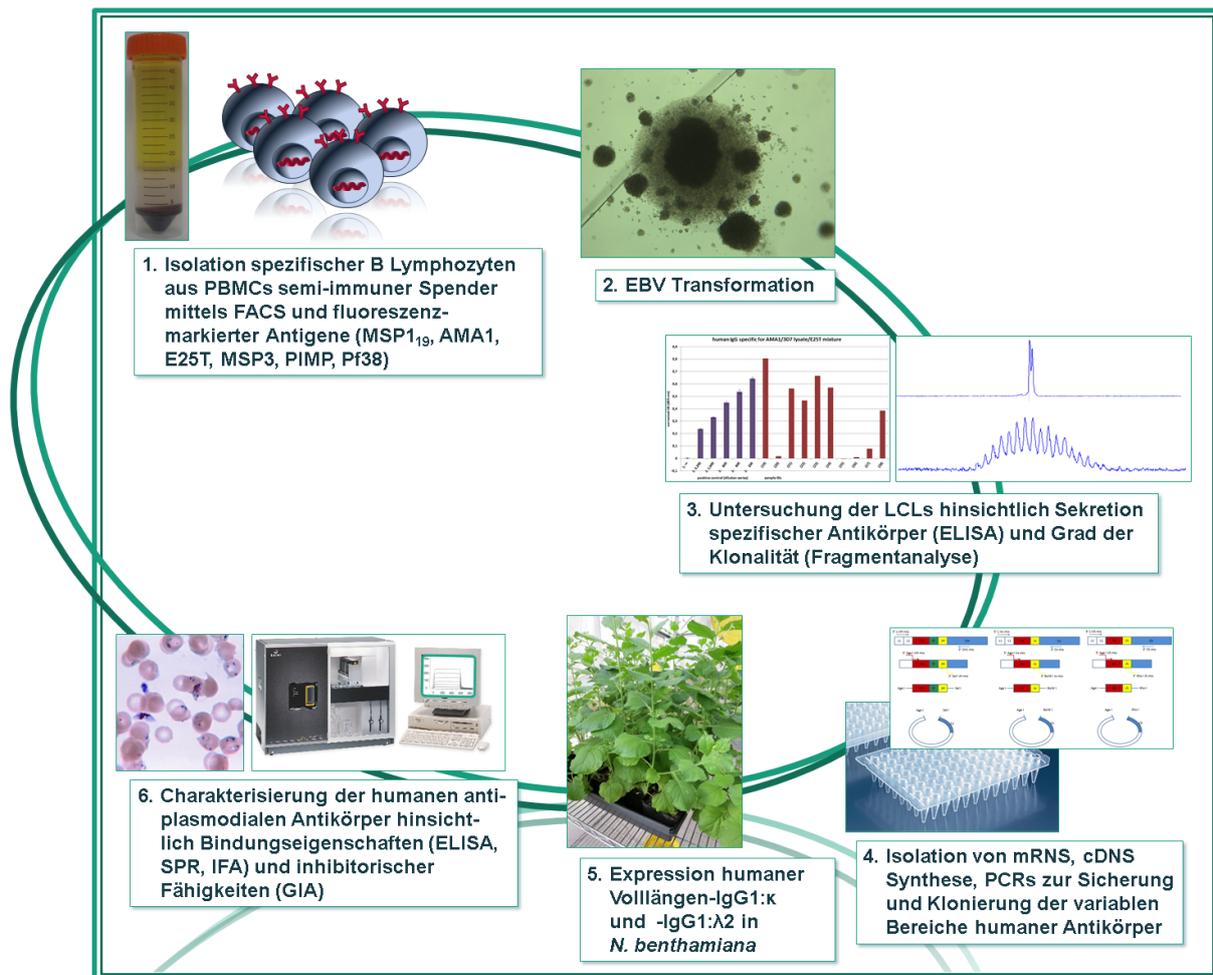


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Herangehensweise zur Generierung humaner monoklonaler Antikörper gegen *Plasmodium falciparum* mittels EBV Transformation von antigenspezifischen B Zellen ghanaischer Spender. 1: Als Quelle antigenspezifischer humaner B Lymphozyten dienen kryokonservierte PBMCs (mononukleäre Leukozyten des peripheren Bluts) semi-immuner Spender aus Kumasi, Ghana. Die durchflusszytometrische Anreicherung spezifischer, reifer IgG⁺ / CD22⁺ B Zellen sollen mithilfe fluoreszenzmarkierter, rekombinant hergestellter plasmodialer Proteine erfolgen. 2: Die EBV Transformation der angereicherten spezifischen IgG⁺ / CD22⁺ B Zellen sollen mithilfe bestrahlter PBMCs eines europäischen Spenders als Versorgerzellen, EBV-reichem B95-8 Zellkulturüberstand und einem synthetischen TLR9-Liganden, CpG ODN 2006, durchgeführt werden. 3: Drei bis fünf Wochen nach der Infektion können die generierten Kulturen charakterisiert werden hinsichtlich Klonalität und Sekretion spezifischer, anti-plasmodialer Antikörper. 4: Aus vielversprechenden Kulturen sollen V_H-, V_κ- und V_λ-Sequenzen humaner Immunglobuline gesichert und in Vektoren kloniert werden, die zur Expression von IgG1:κ und IgG1:λ2 in *Nicotiana benthamiana* geeignet sind. 5: Volllängen-IgG1:κ oder -IgG1:λ2 können sowohl zu Testzwecken als auch zur Produktion größerer Mengen (100-200 mg) in *N. benthamiana* exprimiert werden. 6: Die Untersuchung der generierten anti-plasmodialen humanen Antikörper soll mittels ELISA, Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR), indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (IFA) und Wachstumsinhibitionstests *in vitro* (GIA) bewerkstelligt werden.

Die amplifizierte V_H-, V_κ- und V_λ-Sequenzen sollen anschließend direkt in ihre jeweils geeigneten Expressionsvektoren (pTRAkt_IgG1_H, pTRAkt_Igκ oder pTRAkt_Igλ) kloniert werden oder in einen kommerziellen TopoVektor, der die vorherige Entfernung endogener Restriktionsschnittstellen erlaubt, die die direkte Klonierung in die pTRAkt-Vektoren verhindern würden (Schritt 4, Abbildung 6). Nach Einbringung der pTRAkt-

Expressionsvektoren in *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) und der Vakuuminfiltration von *Nicotiana benthamiana* mit ebendiesen sollen die V_H -, V_K -, und V_L -Regionen im Kontext von Vollängen-IgG1: κ oder -IgG1: λ 2 rekombinant exprimiert werden (Schritt 5, Abbildung 6). Jene Antikörper, die im ELISA plasmodiale Antigene erkennen, sollen in größerem Maßstab in 8-16 *N. benthamiana*-Pflanzen produziert⁹, über Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt und detaillierter charakterisiert werden. Hierzu zählen die Untersuchung (1) der Epitope hinsichtlich der Lage und möglicherweise konformationeller Restriktionen, (2) der Bindungskinetiken und -affinitäten mittels Oberflächenplasmonresonanzmessungen, (3) der Erkennung der authentischen plasmodialen Proteine mithilfe indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (IFA) und (4) der inhibitorischen Eigenschaften *in vitro* (Schritt 6, Abbildung 6).

Idealerweise werden mithilfe dieser Strategie mehrere hochaffine anti-plasmodiale humAbs isoliert, die *P. falciparum*-Stämme unterschiedlichen geographischen Ursprungs zu inhibieren vermögen und die zum weiteren Verständnis der Interaktion zwischen Parasit und dem humanen Wirt beitragen können.

II. Material und Methoden

II.1. Materialien

II.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien und Medienkomponenten wurden bezogen von Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), TIB Molbiol (Berlin), Roche Diagnostics (Mannheim), GE Healthcare (Freiburg), Planta Düngemittel (Regenstauf) und Invitrogen / Life Technologies (Darmstadt). Die Verbrauchsmaterialien wurden bestellt bei Sarstedt (Nümbrecht), GE Healthcare (Freiburg), VWR International (Darmstadt), Biozym (Hessisch Oldendorf), BD Biosciences (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio One (Frickhausen), Roth (Karlsruhe), Whatman (Bender & Hobheim, Bruchsal), Sartorius Stedim (Göttingen), Schott (Mainz), Labomedic (Bonn) und Nunc (Langenselbold).

II.1.2. Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Suspensionen und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt und nach Standardrezepten angesetzt (SAMBROOK und RUSSELL, 2001), sofern nicht anders angegeben. Bei Bedarf wurden die Lösungen und Suspensionen einer Sterilfiltration mit 0,22 µm-Filtern oder einer Dampfsterilisation (121 °C, 20 min) unterzogen. Die folgende Tabelle fasst solche Puffer, Suspensionen und Lösungen und deren Zusammensetzung zusammen, die nicht zum Standardsortiment gehören.

Tabelle 1: Zusammenstellung von Puffern und Medien und deren Zusammensetzung. ‚n.d.‘ : nicht definiert.

Puffer, Lösungen und Medien	Bestandteile	pH	Anmerkung
Albumax II (10X)	1,043% (M/V) RPMI 1640 Pulver 24 mM Hepes 24 mM NaHCO ₃ 25 µg/mL Gentamycin 5% (M/V) Albumax II 0,2 mM Hypoxanthin 0,2% (M/V) D-Glukose	7,0 - 7,4	
D10	DMEM mit „Glutamax“ 10% (V/V) FKS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	7,4	
Erythrozyten-Lysepuffer	11,9 mM NaHCO ₃ 0,5 mM EDTA (pH 8,0) 141,2 mM NaCl	8,0	bei 25 °C lagern
Extraktionspuffer	10 mM Natriumdisulfit in PBS	7,4	frisch bereiten, auf 0 °C kühlen
FACS-Analysepuffer	50 mM Tris (pH 8,0) 150 mM NaCl 2 mM EDTA (pH 8,0) 0,5% (M/V) BSA Fraktion V	8,0	bei -20 °C lagern
FACS-Färbepuffer	2% (V/V) FKS 1 mM EDTA in PBS	7,4	

Tabelle 1. (Fortsetzung)

Puffer, Lösungen und Medien	Bestandteile	pH	Anmerkung
GIA-Substratlösung	75,5 µM APAD 2,44 mM NBT 1 U/mL Diaphorase 100 mM Tris (pH 8,0) 311 mM L-Laktat 0,25% (V/V) Triton X-100	8,0	APAD, NBT und Diaphorase frisch dazugeben
Glycerolyte (Einfriermedium für Plasmodien)	57% (V/V) Glycerin 143 mM L-Laktat 4 mM KCl 25 mM NaH ₂ PO ₄	6,8	sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
HBS-EP-Puffer	10 mM Hepes 150 mM NaCl 3,4 mM EDTA 0,05% (V/V) Tween 20	7,4	durch 0,45 µm Filter filtrieren, Tween20 danach dazugeben
IFA-Färbepuffer	1% (V/V) FKS 0,01% (V/V) Saponin in PBS	7,4	frisch herstellen
Infiltrationsmedium (2X)	45 mM D-Glukose 585 mM Saccharose 0,2% (M/V) Fertymega2 (Planta Düngemittel GmbH)	5,6	
Malariazellkulturmedium (MCM)	90% (V/V) RPMI 1640 25 mM Hepes 10% (V/V) 10X Albumax II 50 µg/mL Gentamycin 2 mM L-Glutamin	7,4	
MCM (2X)	80% (V/V) RPMI 1640 25 mM Hepes 20% (V/V) 10X Albumax II 100 µg/mL Gentamycin 4 mM L-Glutamin	7,4	
NBT/ BCIP-Entwicklungslösung	410 µM NBT 510 µM BCIP 100 mM Tris 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂	9,6	
Percoll-Synchronisierungslösung	70% (M/V) Percoll 7,8% RPMI 1640 2 mM Hepes 160 mM D-Sorbit 30 mM NaCl 0,6 mM KCl 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ 0,3 mM KH ₂ PO ₄	n.d.	frisch herstellen, sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
pLDH-Puffer	100 mM Tris (pH 8,0) 311 mM L-Laktat 0,25% (V/V) Triton X-100	8,0	bei -20 °C lagern
Protein-A-Chromatographie Bindungs-/ Waschpuffer	0,2 M Tris HCl	9,0	
Protein-A-Chromatographie Elutionslösung	0,2 M Natriumzitat	2,5	
Protein-A-Chromatographie Neutralisierungspuffer	1 M Tris HCl	9,0	

Tabelle 1. (Fortsetzung)

Puffer, Lösungen und Medien	Bestandteile	pH	Anmerkung
R10	90% (V/V) RPMI 1640 mit „Glutamax“ 10% (V/V) FKS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	7,4	
R10HP (B Zellmedium)	90% (V/V) RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 25 mM Hepes 1 mM Pyruvat 10% (V/V) FKS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	7,4	
R20HP	80% (V/V) RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 25 mM Hepes 1 mM Pyruvat 20% (V/V) FKS 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	7,4	
SAG-Mannit-Lösung	150 mM NaCl 50 mM D-Glukose 1,2 mM Adenin 28,8 mM D(-)-Mannit	n.d.	sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
Sorbit-Synchronisierungslösung	275 mM D-Sorbit	n.d.	
YEB-Medium	0,5% (M/V) Fleischextrakt 0,1% (M/V) Hefeextrakt 14,6 mM Saccharose 0,5% (M/V) Sojapepton 5,25 mM MgCl ₂	7,4	autoklavieren, bei 25 °C lagern

II.1.3. Antikörper und Enzyme

Die folgenden Tabellen fassen die verwendeten, kommerziell erhältlichen Antikörper und Enzyme zusammen. Der Antikörper 2G12 wurde freundlicherweise von Dr. Jürgen Drossard, (Fraunhofer IME, Aachen) zur Verfügung gestellt. Die Präparation BG98, welches polyklonales, PfAMA1-spezifisches Kaninchen-IgG enthält, wurden freundlicherweise von Dr. Ed Remarque (BPRC, Rijswijk, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Das Hybridom 2.44, das einen murinen monoklonalen Antikörper sezerniert, der sich gegen das EGF-Motiv des PfMSP4 richtet, wurde von Alexander Boes generiert und zur Verfügung gestellt. Das Enzym Diaphorase aus *Clostridium kluyveri* für die Quantifizierung plasmodialer Laktathydrogenase (Abschnitt II.2.2.11.) wurde von Sigma bezogen.

Tabelle 2: Detektionsantikörper für Western Blot und ELISA.

Spezifität	Anbieter	Nachweisenzym	Verdünnung
Maus anti-humanes IgE	Sigma (A3076)	Alkalische Phosphatase	1:4000
Maus anti-humanes IgM	Sigma (A2189)	Alkalische Phosphatase	1:10000
Ziege anti-humanes IgA	Sigma (A9669)	Alkalische Phosphatase	1:5000
Ziege anti-humanes IgG (Fcy)	Jackson (109-055-008)	Alkalische Phosphatase	1:5000
Ziege anti-humanes IgG (H+L)	Promega (S3821)	Alkalische Phosphatase	1:5000
Ziege anti-humanes Igκ	Sigma (A3813)	Alkalische Phosphatase	1:5000
Ziege anti-humanes Igλ	Sigma (A2904)	Alkalische Phosphatase	1:5000

Tabelle 3: Fluoreszenzmarkierte Antikörper zur durchflusszytometrischen Sortierung von B Zellen und zur Verwendung in der Immunfluoreszenzmikroskopie.

Spezifität	Anbieter	Nachweis- fluorochrom	Verdünnung
Esel anti-humanes IgG	Dianova (709-165-149)	Cy3	1:1000
Maus anti-humanes CD19	Biologend (302212)	APC	1 μ L für 2×10^5 vitale Zellen
Maus anti-humanes CD19	Life Technologies (MHCD1904)	RPE	5 μ L für 2×10^5 vitale Zellen
Maus anti-humanes CD22	BD Biosciences (333145)	APC	4 μ L für 10^7 vitale Zellen
Maus anti-humanes CD3	Biologend (300319)	FITC	2 μ L für 2×10^5 vitale Zellen
Maus anti-humanes IgG	BD Pharmingen (555787)	PE	12 μ L für 10^7 vitale Zellen
Ziege anti-humanes IgG	Dianova (109-165-088)	Cy3	1:1000
Ziege anti-humanes IgG	Dianova (109-605-003)	Alexa Fluor 647	1:100
Ziege anti-murines IgG	Invitrogen (A-11001)	Alexa Fluor 488	1:100

Tabelle 4: Enzyme für molekularbiologische Arbeiten.

Name	Anbieter
<i>Age</i> I HF	NEB (R3552)
<i>Bsi</i> WI	NEB (R0553)
<i>Bst</i> NI	NEB (R0168)
<i>Dpn</i> I	NEB (R0176)
Expand High Fidelity PCR System	Roche (04738276001)
HotStarTaq Polymerase	Qiagen (203205)
JumpStart™ REDTaq	Sigma Aldrich (D8187)
<i>Nco</i> I HF	NEB (R3193)
<i>Not</i> I HF	NEB (R3189)
<i>Sal</i> I HF	NEB (R3138)
T4 Ligase	NEB (M0202)
Taq Polymerase	Invitrogen (10342020)
<i>Xba</i> I	NEB (R0145)
<i>Xho</i> I	NEB (R0146)

II.1.4. Matrices zur Reinigung von Proteinen

Die Matrices zur Reinigung von IgG und rekombinanten Proteinen, Protein-A-Keramikmatrix („Protein A Ceramic HyperD“) und Ni²⁺-IMAC-Sepharose („Chelating Sepharose“), wurden von PALL bzw. GE Healthcare bezogen.

II.1.5. Kitsysteme

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene, kommerziell erhältliche Baukastensysteme genutzt, (1) um Proteinkonzentrationen zu bestimmen, (2) um gereinigte Proteine mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 488 zu versehen, (3) um Nukleinsäuren zu reinigen, (4) um mRNA oder cDNA zu generieren oder (5) um PCR-Amplifikate ohne vorherigen Restriktionsverdau in einen Vektor zu klonieren. Die folgende Tabelle fasst die genutzten Kitsysteme zusammen.

Tabelle 5: Überblick der verwendeten Baukastensysteme.

Name	Anbieter
„Alexa Fluor® 488 Antibody Labeling“ Kit	Life Technologies (A-20181)
„BCA Protein Assay Kit“	Thermo Scientific (23227)
„NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit	Macherey und Nagel (740609)
„NucleoSpin Plasmid“ Kit	Macherey und Nagel (740588)
„NucleoSpin RNA II“ RNS-Isolationskit	Macherey und Nagel (740955)
„NucleoSpin Tissue“ Kit zur Isolation genomischer DNS	Macherey und Nagel (740952)
„RNeasy Plus Mini“ RNS-Isolationskit	Qiagen (74134)
„SuperScript III CellsDirect“ cDNA Synthesekit	Life Technologies (18.080.300)
„SuperScript III First Strand“ cDNA Synthesekit	Life Technologies (18.080.051)
„TOPO TA“ Cloning Kit	Life Technologies (45-0641)

II.1.6. Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Amplifizierung, zur Klonierung und zur Fragmentanalyse wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bestellt. Primer zur Sicherung variabler Bereiche humaner Antikörper sind in der Publikation von TILLER *et al.* (2008) beschrieben und sind im Anhang aufgeführt. Weitere, im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Primer zur Klonierung schwerer und leichter Immunglobulinketten finden in Tabelle 6 Erwähnung.

Tabelle 6: Zusammenstellung des erweiterten Primersets zur Sicherung und Klonierung variabler Bereiche humaner Antikörper. Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichung markiert.

Bezeichnung	Sequenz
Primer für die Sicherung und Klonierung von V_H-Bereichen:	
L-VH2	5'-GGCTTCATCTTCTTATGYYTTCTCCACAGGGTCTTTRCC-3'
L-VH3 NEW	5'-GTTTGCAGGTGCCAGTGTGARGTGCAG-3'
L-VH4 NEW	5'-ACAGGGGTCCCTGTCCCAGSTGCAGCT-3'
L-VH6 NEW	5'-CTTTTGTCTCCAGGTGTCCTGTCCACAGGTACAG-3'
L-VH7	5'-GTGCCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTG-3'
L-VH1-18, 1-8	5'-CACAGGTGCCCACTCCCAGGTKCAGCTG-3'
L-VH1-2	5'-CACAGGAGCCCACTCCCAGGTGCAGCTG-3'
L-VH1-24	5'-CACAGGCACCCACGCCAGGTCCAGC-3'
L-VH1-3	5'-TACAGGTGYCCACTCCCAGGTTCAGCTK-3'
L-VH1-45	5'-CACAGATGCCTACTCCCAGATGCAGCTG-3'
L-VH1-46	5'-CGCAGGTGCYCACTCCCAGGTGCAGC-3'
L-VH1-58	5'-CACAGGTGCCCACTCCCAAATGCAGCTG-3'
L-VH1-69*1,*4	5'-CACAGGTGTCCAGTCCCAGGTSCAGCTG-3'
L-VH1-69*3	5'-CAGAGGTGTCCACTCCCAGGTSCAGCTG-3'
3' C(α) CH1	5'-GCCCTGGACCAGGCAGGCGATG-3'
3' C(ε) CH1	5'-TGCTTGGCCACGCACCCGAGACG-3'
3' C(δ) CH1	5'-GGGCTGTTATCCTTTGGGTGTC-3'
Age I VH 6F10	5'-AACTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTCAGGTGCAGGTGCAGG-3'
Age I VH 1E4 No1	5'-AACTGCA <u>ACCGGT</u> GTGCACTCCCAGGTGCAGC-3'
Age I VH 1E4 No2	5'-AACTGCA <u>ACCGGT</u> GTCCAGTGTGAAGTGCAGCTG-3'
Age I VH3 1D9	5'-AACTGCA <u>ACCGGT</u> GTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGCAA-3'
H 11C10 AgeI	5'-AACTGCA <u>ACCGGT</u> GCCCACTCCCAGGTGCAGC-3'
Sal I JH 1D9	5'-AATGCGA <u>AGTCGAC</u> GCTGAAGACACAGTGATCATTGTCC-3'

Tabelle 6. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz
3498 Sal I JH	5'-ATGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGATGACCAG-3'
Sal JH 1E4 No1	5'-AAAAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGATC-3'
Sal JH 1E4 No2	5'-AATGCGAAGTCGACGCCACGACACCGTCACCGGTT-3'
Primer für die Sicherung und Klonierung von V_κ-Bereichen:	
L-VK3D-7*01	5'-CACAGCTTCTTCTTCCTCCTGCTACTC-3'
L-VK5-2*01	5'-AGCTTCCTCCTCCTTTGGATCTCT-3'
L-VK1-37*01, L-VK1D-37*01, LVK1D-42*01	5'-ATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGG-3'
L-VK2D-24*01	5'-CTCCTTGCTCAGCTTCTGGGGCTG-3'
L-VK6-21*01, L-VK6D-21*01	5'-CATTGGGTTTCTGCTGCTCTGGGTT-3'
L-VK6D-41*01	5'-ATTCTGCGGCTTCTGCTCCTCTGGG-3'
L-VK7-3*01	5'-GGGGCTCCTTTGCTGTGGATCCTCC-3'
11C10KDM1 for	5'-AACTGCAACCGGTACGTCACGAAATTGTGC-3'
11C10KDM1 bw	5'-AAGCCACCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTC-3'
11C10KDM18 for	5'-AACTGCAACCGGTGTACATGGGTTCCGCCCT-3'
11C10KDM18 bw	5'-AAGCCACCGTACGTTTGATTCCACCTTGGTC-3'
11C10KDM27for	5'-TTGTGCTGCAACCGGTGTACATACCCAGACTCCAGTCTCC-3'
11C10KDM31for	5'-GTGCTGCAACCGGTGTACATTAGAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCATTC-3'
11C10KDM31back	5'-AAGCCACCGTACGTTTGACTTCCACCTTG-3'
11C10KDM13for	5'-CTGCAACCGGTGTACATTAGAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGCCACC-3'
11C10KDM13back	5'-AAGCCACCGTACGTTTGATTCCACCTTGGTCCC-3'
11C10KDM28for	5'-ACTGCAACCGGTGTACATTGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCACTC-3'
11C10KDM28back	5'-AAGCCACCGTACGTTTGATCTCCAGTTTGG-3'
11C10KDM3for	5'-AACTGCAACCGGTGTGACGAAATTGTGCTGACTC-3'
11C10KDM29for	5'-AACTGCAACCGGTACCCAGTCTCCATTCTCCC-3'
11C10KDM30for	5'-CTGCAACCGGTGTACATTCGGACATCGTGATGACCCAGACTCCAGTCAC-3'
11C10KDM32for	5'-ACTGCAACCGGTGTACATTCCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCC-3'
Primer für die Sicherung und Klonierung von V_λ-Bereichen:	
AgeIV3LambdaDM	5'-AAAGTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTG-3'
AgeIV2LambdaDM	5'-AAACTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGC-3'
XhoIILambdaDM	5'-AACTCCTCACTCGAGGGCGGGAACAGAGTG-3'
AgeIV2LambdaDM	5'-AAACTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGC-3'
XhoIILambdaDM	5'-AACTCCTCACTCGAGGGCGGGAACAGAGTG-3'

Einige der gesicherten variablen Sequenzen humaner Antikörper trugen endogene, d.h. nicht künstlich eingeführte Restriktionsschnittstellen, die die direkte Klonierung in die Expressionsvektoren unmöglich machten. Daher wurden solche Schnittstellen mittels zielgerichteter Mutagenese entfernt ohne die Aminosäureabfolge zu ändern oder ein seltenes Kodon einzuführen. Da es galt die Antikörper in Tabak zu exprimieren, wurde die „codon usage“ von *N. benthamiana* als Grundlage herangezogen (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). Tabelle 7 fasst die für die Mutagenese benutzten Oligonukleotide zusammen. Die Methode der zielgerichteten Mutagenese ist in Abschnitt II.2.3.6. beschrieben.

Tabelle 7: Primer zur zielgerichteten Mutagenese von variablen Bereichen humaner Antikörper.

Bezeichnung	Sequenz
c39g_fw	5'-GACTCTCCATGTTCGGTGGACACATCCAGGAATC-3'
c39g_rev	5'-GATTCCTGGATGTGTCCACCGACATGGAGAGTC-3'
1E4 No1 mut bw	5'-CTGACAAGGTGAGTCGGCTCTTGAGGGCCTCATTG-3'
1E4 No1 mut forw	5'-CAATGAGGCCCTCAAGAGCCGACTCACCTTGTCAG-3'
4C4k mut backw	5'-CTTTGGTCCCAGGGCCGAAGTGAATAGGACAACCTATAATATTG-3'
4C4k mut forw	5'-CAATATTATAGTTGTCTTATTCACTTCGGCCCTGGGACCAAAG-3'
11C10KDM28repfor	5'-CACTCTCACCATCACCGGCGTACAGCCCCGAAGATTCTG-3'
11C10KDM28repbw	5'-CAGAATCTTCGGGCTGTACGCCGGTGTGGTGAGAGTG-3'

Für Kolonien-PCRs und für Sequenzierungen wurden die folgenden Oligonukleotide eingesetzt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Primer für Kolonien-PCRs.

Bezeichnung	Sequenz	Vektor
PS5'	5'-ATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCT-3'	pTRAkt
PS3'	5'-AGAGAGAGATAGATTTGTAGAGA-3'	
M13 Reverse	5'-ACACAGGAAACAGCTATGAC-3'	TopoVektor
M13 Universe	5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'	

Die Entscheidung über die Klonalität der aus B Lymphozyten generierten Zellreihen erfolgte aufgrund einer Fragmentanalyse der Amplifikate dreier PCR-Reaktionen. Diese Methode wird unter II.2.3.5. genauer beschrieben. Die verwendeten Primer sind jene, die von FRAUSSEN *et al.* (2010) publiziert wurden, und sind in Tabelle 20 im Anhang zu finden.

II.1.7. Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren waren pCR[®] II-TOPO[®] von Life Technologies für die unter Abschnitt II.2.3.4. beschriebene Topo-Klonierung, und drei Vektoren zur apoplastischen Expression von humanem Volllängen-IgG1:κ oder -IgG1:λ2 in *N. benthamiana*. Abbildung 7 stellt exemplarisch die Vektorkarte für die schwere Kette (IgG1) dar. Diese drei pTRAkt Vektoren wurden von Holger Spiegel entwickelt, um eine Klonierung der V_H-, V_κ- und V_λ-Bereiche über das von TILLER *et al.* (2008) beschriebene Primersset zu ermöglichen.

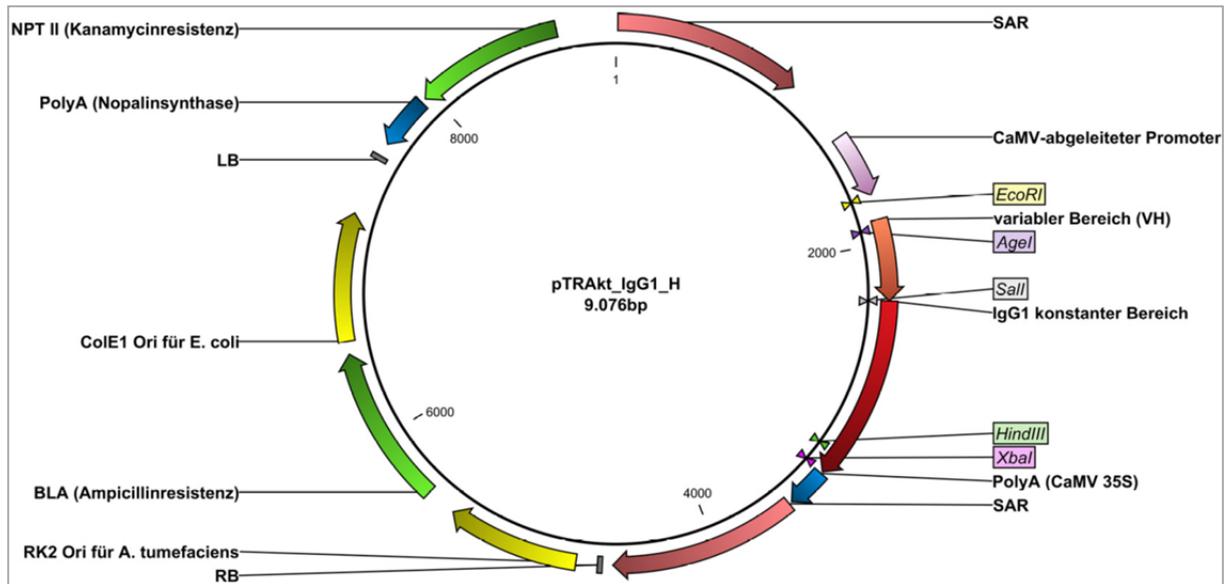


Abbildung 7: Vektorkarte des Vektors pTRAkt_IgG1_H zur apoplastischen Expression von IgG1 schweren Ketten in *N. benthamiana*. Dieser Vektor wurde von H. Spiegel entwickelt und ermöglicht die Klonierung der variablen Bereiche humaner schwerer Immunglobulinketten (V_H) über die entsprechenden von TILLER *et al.* (2008) publizierten Primer. Die Klonierung erfolgt hierbei über *Age* I und *Sal* I. Es existieren zwei weitere, gleichartige Vektoren für die apoplastische Expression von humanen κ und λ leichten Immunglobulinketten. Statt dem hier in dunkelrot dargestellten konstanten Bereich von humanem IgG1 kodieren die Vektoren für die leichten Ketten den konstanten Bereich von humanem Ig κ bzw. Ig λ 2. Für die Klonierung dieser sind ebenfalls die von TILLER und Kollegen beschriebenen Oligonukleotide geeignet; sie ermöglichen die Einbringung der variablen Bereiche der leichten Ketten über *Age* I / *Bsi* WI (V_κ) bzw. *Age* I / *Xho* I (V_λ). ‚LB‘: ‚left border‘; ‚RB‘: ‚right border‘; ‚Ori‘: ‚origin of replication‘; ‚PolyA‘ : Polyadenylierungssequenz; ‚SAR‘: ‚scaffold attachment region‘.

II.1.8. Zelllinien

Die Zelllinien DG-75, Jurkat, Kasumi-1, Raji, Ramos und U-937 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die Zelllinie B95-8 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Lothar Rink zur Verfügung gestellt. Die folgende Tabelle fasst einige der Eigenschaften der genannten Zelllinien zusammen.

Tabelle 9: Zusammenstellung von Eigenschaften eukaryotischer Zelllinien. ‚n.d.‘: nicht definiert. Die Angaben zu den immunologischen Markern sind nicht vollständig.

Name	Ursprung	Immunologische Marker	Viren
B95-8	Marmosettäffchen (<i>Saguinus oedipus</i>), Lymphozyten	n.d.	EBV +, HBV -, HCV -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -
DG-75	Burkitt Lymphom, human	CD3 -, CD10 +, CD13 -, CD19 +, CD30 -, CD34 -, CD37 +, CD38 +, CD80 +, CD138 -, CD153+, HLA-DR +, cyIgG -, cyIgM +, $\text{cy}\kappa$ +, $\text{cy}\lambda$ -	EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -
Jurkat	Akute Lymphoblastische T Zelleukämie, human	CD2 +, CD3 +, CD4 +, CD5 +, CD6 +, CD7 +, CD8 -, CD13 -, CD19 -, TCR α / β +, TCR γ / δ -	EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -
Kasumi-1	Akute Myeloische Leukämie, human	CD3 -, CD4 +, CD13 +, CD14 -, CD15 +, CD19 -, CD33 +, CD34 +, CD38 +, CD71 +, HLA-DR +	EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -

Tabelle 9. (Fortsetzung)

Name	Ursprung	Immunologische Marker	Viren
Raji	Burkitt Lymphom, human	CD3 -, CD10 +, CD13 -, CD19 +, CD20 +, CD34 -, CD37 +, CD38 +, cyCD79a +, CD80 +, CD138 -, HLA-DR +, sm/cyIgG -, smIgM -, cyIgM +, sm/cy κ -, sm/cy λ -	EBV +, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -
Ramos	Burkitt Lymphom, human	CD3 -, CD10 +, CD13 -, CD19 +, CD20 +, CD34 -, CD37 +, CD38 +, cyCD79a +, CD80 +, CD138 -, HLA-DR +, sm/cyIgG -, sm/cyIgM +, sm/cy κ -, sm/cy λ +	EBV -, HBV -, HCV -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -
U-937	Histiozytäres Lymphom, human	CD3 -, CD4 +, CD14 -, CD15 +, CD19 -, CD33 +, CD34 -, CD54 +	EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -

II.1.9. Plasmodien

Die *P. falciparum*-Stämme 3D7, K1, W2mef, Dd2, HB3 und FCR-3 wurden bei MR4 (Manassas, Virginia, USA) bestellt. Der Stamm 3D7 wurde 1987 beschrieben (WALLIKER *et al.*, 1987), ist vollständig sequenziert (GARDNER *et al.*, 2002) und kann in Erythrozyten sowohl über sialinsäureabhängige als auch -unabhängige Invasionswege eindringen (DURASINGH *et al.*, 2003). Auch eine vorherige Behandlung der roten Blutkörperchen mit Chymotrypsin (PERSSON *et al.*, 2008) oder Trypsin (GAUR *et al.*, 2003) führt nicht zur vollständigen Unterbindung der Invasion. *P. falciparum* 3D7 gilt als der am besten charakterisierte Stamm und wird daher am Häufigsten eingesetzt. Die anderen Stämme sind unterschiedlichen geographischen Ursprungs¹⁰ und sind phylogenetisch weit von Stamm 3D7 entfernt (DREW *et al.*, 2012). Somit kann mit diesen Stämmen eine große Vielfalt/Variabilität abgedeckt werden. *P. falciparum* Dd2 stammt von W2mef ab und wurde durch Subklonierung unter verstärktem Selektionsdruck mit Mefloquin erzeugt (GUINET *et al.*, 1996).

II.1.10. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterien waren *Escherichia coli* DH5 α und *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) GV3101::pMP90RK. *E. coli* DH5 α verfügt über die folgenden genotypischen Merkmale: F⁻ (f80d Lac2 Δ M15) Δ (LacZYA-*arfF*) U169end A1 rec1 hsdR17 (r_k^- m $_k^-$) deo R thi⁻ supE44 gyr A96 relA1 λ^- (AUSUBEL *et al.*, 1994). Das in *A. tumefaciens* GV3101::pMP90RK enthaltene, unschädlich gemachte Ti-Helferplasmid pMP90RK kodiert für Gentamycin- und Kanamycinresistenzen (KONCZ und SCHELL, 1986; RADEMACHER *et al.*, 2008).

II.1.11. Geräte

Die folgende Tabelle fasst die verwendeten Geräte zusammen.

Tabelle 10: Geräteliste.

Gerät / Funktion	Bezeichnung / Modell	Hersteller
Autoklav	Varioklav (H+P) 75S	Thermo Electron Corporation
Dewar	Voyageur 12	Air Liquide
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences
	Influx Cell Sorter (V7)	BD Biosciences
	FACSAria II	BD Biosciences
Eismaschine	Icematic D201	Castel Mac
Elektrophoresekammer zum Transfer von Proteinen	Mini Trans Blot Cell	BioRad
Elektrophoresekammer zur Auftrennung von DNS/ RNS	SUB-CELL GT	BioRad
Elektroporator	Electroporator 2510	Eppendorf
Entsalzungsanlage für Wasser	Membra-Pure MemCap 1 0,2 µm PES	Millipore Corporation
FPLC	ÄKTA-FPLC	GE Healthcare
	ÄKTA-Purifier	GE Healthcare
Geräte zum Mischen / Schütteln von Flüssigkeiten / Suspensionen	VortexGenie2	Scientific Industries
	Titramax 1000 für Mikrotiterplatten	Heidolph
	WS-10	Edmund Bühler
	VKS-75 Control	Edmund Bühler
	RCT basic (Magnetrührer)	IKA
	Thermomixer comfort, compact	Eppendorf
Gerät zur DNS-Sequenzierung und -Fragmentanalyse	3730 DNA Analyser	Applied Biosystems
Gerät zur Zellkonzentrationsbestimmung	Casy1	Schärfe System
Gerät zur Zellwäsche	Dade Serocent	Dade
Heizblöcke	QBT	Grant
	Thermomixer comfort, compact	Eppendorf
HPLC	UltiMate 3000 HPLC System	Dionex
Inkubatoren	Function Line Typ UT12	Heraeus
	CB210	Binder
	INCO 153	Memmert
Kameras	Coolpix 4500	Nikon
	Ixus 60	Canon
Lyophilisator	ALPHA 1-4 LSC	Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode
Massenspektrometer	amaZon ETD MS Ionenfallen-Massenspektrometer	Bruker Daltonics
Mikroskope	IT400	VWR
	Leica DMIL	Leica
	Leica CTR 6000	Leica
	Opera	Perkin Elmer
Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	Leica TCS SP8	Leica
	Biacore T100	Biacore/ GE Healthcare
	Biacore T200	Biacore/ GE Healthcare
peristaltische Pumpen	Masterflex L/S Economy Drive	Cole Parmer
pH-Meter	Basic Meter PB-11	Sartorius Stedim
Pipetten	Transferpette -8/-12 electronic	Brand
	Research Pro	Eppendorf
	CellMate II Pipettus	Matrix
	Pipetman Starter Kit	Gilson
Polyacrylamid-gelektrophoresekammer	Mini-Protean 3 Cell	BioRad

Tabelle 10. (Fortsetzung)

Gerät / Funktion	Bezeichnung / Modell	Hersteller
Scanner	HP Scanjet 4890	Hewlett Packard
	9000F Mark II	Canon
Spektrophotometer	ELx808	BioTek
	Synergy HT	BioTek
	ND-1000	Nanodrop
	Biophotometer	Eppendorf
	Epoch	BioTek
Thermocycler	Primus 96 plus	MWG Biotech
	Veriti 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems
	FlexCycler2	AnalytikJena
UV-Transilluminator für Agarosegele	Molecular Imager Gel Doc XR	BioRad
Wagen	Talent: TE6101, TE64, TE31025, TE12000	Sartorius Stedim
	TW20	Julabo
Wasserbäder	Inkubations- / Inaktivierungsbad 1003	GFL
	Herasafe Typ HS-9	Heraeus
Werkbänke zum sterilen Arbeiten	Biowizard 2 MSC	Kojair
	Telstar AV-100	Progen Scientific
	5415D und 5415R	Eppendorf
	CEPA LE	Carl Padberg Zentrifugenbau
	Multifuge 1S und 3S-R	Heraeus
Zentrifugen	Microcentrifuge	NeoLab
	Biofuge Primo R	Heraeus
	PICO Fuge	Stratagene
	Microcentrifuge AL	Roth
	Allegra 6KR	Beckman Coulter
	Avanti J-25I Centrifuge	Beckman Coulter
	Rotina 420R	Hettich Zentrifugen

II.1.12. Software

In der folgenden Tabelle sind die genutzten Programme zusammengestellt.

Tabelle 11: Liste der verwendeten Software.

Name	Anwendung
Acapella (Perkin Elmer)	Auswertung von Bildmaterial
Biacore 2000 Control V3.2.1 (GE Healthcare)	Bedienung des Biacore2000 Systems
BiaEvaluation 4.1 (GE Healthcare)	Interpretation der Oberflächenplasmonresonanzdaten
CLC Main Workbench (CLC Bio)	Analyse von DNS-Sequenzdaten, <i>in silico</i> -Klonierungen
Compass DataAnalysis Version 4.0-SR5 (Bruker)	Analyse der Rohdaten massenspektrometrischer Analysen
Excel 2007, Excel 2010 (Microsoft)	Auswertung und grafische Darstellung von Messdaten
EvoShell (Perkin Elmer)	Bedienung des Opera Mikroskops
FACSDiva (BD Biosciences)	Bedienung des FACSAria II Zytometers
Gen5 Version 2.01 (BioTek)	Bedienung von Spektrophotometern
GraphPad Prism (GraphPad Software)	Auswertung von Wachstumsinhibitionstests
LAS AF Lite Version 2.6.3_8173 und LAS AF Version 3.1.3 (Leica)	Bedienung des Leica TCS SP8 Mikroskops, Darstellung der damit generierten Aufnahmen
LASF (Leica)	Bedienung des Leica CTR 6000 Mikroskops

Tabelle 11. (Fortsetzung)

Name	Anwendung
Mascot Distiller 2.3.2.0, Mascot Search 2.3.01 (Matrix Science)	Analyse der Rohdaten massenspektrometrischer Analysen
Photoshop CS5 Extended Version 12.1 x32 (Adobe)	Bearbeitung und Analyse von Bildmaterial
Quantity One (BioRad)	Bedienung des UV-Transilluminators
Sortware (BD Biosciences)	Bedienung des BD Influx Zytometers
Unicorn (Amersham Biosciences)	Bedienung des FPLC Systems
WinMDI 2.9. (Joseph Trotter)	Analyse durchflusszytometrischer Daten

II.1.13. Bioinformatische Analysen

Zur Analyse der gesicherten variablen Sequenzen humaner Antikörper wurde das „V Quest“ Werkzeug (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg; BROCHET *et al.*, 2008) verwendet.

Die Analyse der variablen Bereiche und der entsprechenden kodierenden Sequenzen hinsichtlich Aminosäure- / Nukleotidabfolge, Homologie / Ähnlichkeit und Identität wurde mithilfe der Algorithmen „Clustal Omega“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) und „Ident and Sim“ (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html; STOTHARD, 2000) angestellt.

„ESPrpt 3.0“ (<http://esprpt.ibcp.fr>) diente zur Übertragung von Sekundärstrukturinformationen auf Alignments (ROBERT und GOUET, 2014).

Zur Vorhersage / Wahrscheinlichkeitsbestimmung von N- und O-Glykosylierungen und von Tyrosin O-Sulfatierungen wurden die folgenden Algorithmen genutzt: „NetOGlyc“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>; STEENTOFT *et al.*, 2013); „NetNGlyc“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) bzw. „Sulfinator“ (<http://web.expasy.org/sulfinator/>).

Die beim tryptischen Verdau zu erwartenden Peptide wurden mittels „Peptide Cutter“ (http://web.expasy.org/peptide_cutter/) vorhergesagt.

II.2. Methoden

II.2.1. Proteinchemische und immunologische Methoden

II.2.1.1. Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäuretest (BCA)

Die Konzentration gelöster Proteine wurde mithilfe von Bicinchoninsäure gemessen (SMITH *et al.*, 1985). Hierzu wurde das Kit „BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Scientific) verwendet. Vergleichsgeraden wurden mit 0 – 50 µg/mL BSA (Fraktion V) bestimmt, zu testende Lösungen wurde im Dreifachansatz gemessen.

II.2.1.2. Chemische Fluoreszenzmarkierung plasmodialer Antigene

Zur Fluoreszenzmarkierung rekombinant produzierter plasmodialer Proteine, MSP1₁₉, AMA1 (DiCo 1+2+3), MSP3, Pf38, PIMP und E25T, ¹¹, ¹² wurde ein Baukastensystem genutzt („Alexa Fluor® 488 Antibody Labeling Kit“ (Life Technologies)) oder die entsprechende reaktive Komponente dieses Kits („Alexa Fluor® 488 5-TFP“). Bei Anwendung des Baukastensystems wurde nach den Herstellerangaben verfahren. Im anderen Fall wurden 50 – 100 µg Protein eingesetzt und diese mit 0,5 mg/mL oder 1 mg/mL „Alexa Fluor® 488 5-TFP“ in 100 oder 200 mM Bikarbonatpuffer (pH 9,0) unter Lichtausschluss eine Stunde lang bei 25 °C leicht geschüttelt. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend durch eine Gelfiltration entfernt. Hierzu wurde „Sephadex-G25“ Matrix (Sigma Aldrich) genutzt, die in PBS äquilibriert und in 1 mL-Säulchen vorlag. Die durchschnittliche Anzahl Farbstoffmoleküle je Proteinmolekül wurde approximiert. Durch die Messung der Absorption bei 494 nm kann über das Lambert-Beer'sche Gesetz die Konzentration des vorhandenen Alexa Fluor 488 bestimmt werden:

$$E_{494 \text{ nm}} = c \cdot d \cdot \epsilon_{494 \text{ nm}}, \text{ mit}$$

c : Konzentration [mol/L]
d : Schichtdicke [cm], hier 0,05 cm
 $\epsilon_{494 \text{ nm}}$: molarer Extinktionskoeffizient [cm² / mol], hier 71000 cm² / mol.

Bestimmt man erneut die totale Konzentration des löslichen Proteins mittels BCA, lässt sich diese zur Menge des chemisch gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs in Relation setzen.

II.2.1.3. Reduktion und Alkylierung rekombinanter Proteine

Zur Untersuchung der konformationellen Abhängigkeit der Epitoperkennung durch die generierten Antikörper wurden die rekombinant exprimierten, plasmodialen Proteine E25T, multi-PfEGF-his₆, dsRed-MSP10-EGF1 und dsRed-MSP10-EGF2 in 5 mM DTT reduziert. Hierzu wurden sie 45 min bei 56 °C geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 mM 2-Iodacetamid und eine Inkubation für 30 min bei 25 °C gestoppt. Überschüssiges 2-Iodacetamid wurde durch erneute Zugabe von 5 mM DTT und eine Inkubation für 30 min bei 25 °C entfernt. (Siehe auch: http://proteomicsresource.washington.edu/docs/protocols03/UWPR_Protocols_Protein_Digestion_Protocols.pdf.)

II.2.1.4. SDS-PAGE

Zur groben Analyse von Proteinen / Proteingemischen wurden diese per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (DAVIS, 1964; LAEMMLI, 1970) und die Gele anschließend mit Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt (WILSON, 1983) oder zum Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Abschnitt II.2.1.5.) benutzt. Proteinhaltige Proben wurden mit reduzierendem oder nicht reduzierendem Beladungspuffer versetzt und 5 min bei 100 °C erhitzt. Kondenswasser in den Deckeln wurde der Probe mittels kurzer Zentrifugation zurückgeführt. Die aufgekochten Ansätze wurden vor der Beladung der Gele wieder auf Eis gelagert. Die verwendeten diskontinuierlichen Gele hatten die folgenden Eigenschaften. Sammelgele hatten einen pH von 6,8 und C- und T-Werte von 2,6% bzw. 5%. Trenngele besaßen einen pH von 8,8, einen C-Wert von 2,6% und T-Werte von 12% oder 15%. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 200 V für 45-60 min. Als Größenstandard wurde der „Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa)“ von NEB verwendet.

II.2.1.5. Western Blot

Um einen immunologischen Nachweis der per SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durchzuführen, wurden diese im elektrischen Feld (180 mA, 45 min) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (TOWBIN *et al.*, 1979; KYHSE-ANDERSEN, 1984). Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation in 1% (M/V) BSA in PBS für 60 min bei 25 °C oder für 16 h bei 4 °C, wurde der Detektionsantikörper hinzugegeben. Dieser AP-markierte Antikörper (Ziege anti-humanes IgG(H+L)) wurde 1:5000 in 1% (M/V) BSA in PBS suspendiert und die Membran für 60 min bei 25 °C darin geschüttelt. Die Membran wurde nun dreimal in 0,1% (V/V) Triton-X100 in PBS gewaschen, einmal mit PBS gespült und der Blot durch Zugabe von NBT/ BCIP und 5- bis 15-minütiges Schütteln bei 25 °C in Dunkelheit entwickelt.

II.2.1.6. Dotblot

Dotblots wurden durchgeführt, um grobe Epitopkartierungen durchzuführen oder um zu überprüfen, ob lymphoblastoide Zellreihen/ -linien Immunglobuline sezernieren. Im letzten Fall wurden je 3 µL der zu testenden Überstände (II.2.2.4.) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Als Positivkontrolle wurde eine Verdünnungsreihe einer Mischung aus vier ghanaischen Seren verwendet (1:100 bis 1:3200). Die Seren stammten von den Spendern 0001, 0005, 0009 und 0026. Nach 15 min Trocknungszeit wurde die Membran 60 min bei 25 °C in 5% (M/V) Magermilchpulver in PBS inkubiert. Als AP-markierte Nachweisantikörper wurden Ziege anti-humanes IgG (H+L) (1:5000), Ziege anti-humanes IgA (1:5000), Maus anti-humanes IgE (1:4000) und/ oder Maus anti-humanes IgM (1:10000) in 5% (M/V) Magermilchpulver in PBS verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei 25 °C wurde die Membran fünfmal in 0,05% (V/V) Triton X-100 in PBS gewaschen, einmal mit PBS gespült, und entwickelt wie für Western Blots beschrieben. Zur Eingrenzung der Epitope der generierten humanen monoklonalen Antikörper wurden native oder reduzierte/ alkylierte plasmidiale Antigene auf Nitrozellulosemembranen aufgebracht. Nach den Trocknungs- und Blockierungsschritten (60 min) wurden die Membranen in Lösungen der Primärantikörper (humAb10.1, 10.2 oder 10.3) 60 min bei 25 °C in 5% (M/V) Magermilchpulver in PBS

inkubiert und fünf Male gewaschen (0,05% (V/V) Triton X-100 in PBS). Die folgenden Schritte entsprachen denen für den Nachweis sezernierter Antikörper in Zellkulturüberständen.

II.2.1.7. Durchflusszytometrie zur Sortierung antigenspezifischer B Zellen

Tiefgefrorene ghanaische PBMCs, aus denen antigenspezifische, reife B Zellen angereichert werden sollten, wurden sanft im 37 °C Wasserbad erwärmt bis die Hälfte der Suspension aufgetaut war. Die Zellen wurden in 10 mL R10 Medium aufgenommen und einmal gewaschen (250 xg, 5 min), um das ursprünglich im Gefriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Die Färbung der Zellen erfolgte in FACS-Färbepuffer 30 min auf Eis und in Dunkelheit mit einer Zelldichte von 5×10^7 / mL. Hierzu wurde ein steriler Mix aus zwei Antikörpern, PE-markiertes anti-humanes IgG und APC-markiertes anti-humanes CD22, und sechs Alexa Fluor 488-markierten Antigenen, MSP1₁₉, MSP3, AMA1, Pf38, PIMP und E25T (0,42 - 4,2 µg/10⁷ Zellen), genutzt. Nach drei Waschschritten mit je 5 mL eiskaltem FACS-Färbepuffer (250 xg, 5 min, ohne Bremse) wurden Zellaggregate mit einem sterilen 33 µm-Sieb entfernt und die Zellen in partikelfreiem R10HP Medium aufgenommen. Die Anreicherung der antigenspezifischen IgG⁺ / CD22⁺ und IgG⁻ / CD22⁺ B Lymphozyten erfolgte mit einem „FACS Aria II“ oder „BD Influx“ Gerät (BD Biosciences)¹³ in zwei unterschiedliche sterile Sammelgefäße, in welche R20HP Medium vorlegt worden war. Beim „BD Influx“ Zytometer wurde mit der Einstellung „Purity“ sortiert; es wurde eine 100 µm-Düse verwendet. Der Druck der Hüllflüssigkeit wurde so niedrig wie möglich gesetzt, um einen Kompromiss zu finden zwischen minimalem Scherstress und einer angebrachten Sortiergeschwindigkeit (1000 Ereignisse / sec). Der Druck der Hüllflüssigkeit betrug dabei etwa 3,4 kPa weniger als der der Probenflüssigkeit; geeignete Werte waren etwa 99,28 kPa für die Hüllflüssigkeit und 102,73 kPa für den Strom der Probe. Die Justierung der Durchflusszytometer wurde mit vier Kontrollen durchgeführt. Kryokonservierte PBMCs eines europäischen Spenders wurden behandelt wie für die ghanaischen PBMCs beschrieben. Für die Autofluoreszenzprobe wurde kein Antikörper zugegeben, für die Kompensierungsproben wurde je einer der folgenden drei Antikörper genutzt: anti-CD3-FITC (2 µL je 2×10^5 vitaler Zellen), anti-CD19-RPE (5 µL je 2×10^5 vitaler Zellen) oder anti-CD19-APC (1 µL je 2×10^5 vitaler Zellen).

II.2.1.8. ELISA

Zur Untersuchung der Reaktivitäten ghanaischer Seren, lymphoblastoider Zellkulturüberstände oder der monoklonalen humanen Antikörper wurden ELISA durchgeführt. Mengen von 100 ng E25T, multi-PfEGF-his₆, dsRed-MSP10-EGF1 oder dsRed-MSP10-EGF2 wurden je Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit hoher Bindungskapazität abgelegt. Den Proteinen wurde bei 4 °C 16 h Zeit gegeben an die Platte zu adsorbieren. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% (V/V) Tween20 in PBS wurden freibleibende Binstellen 2-3 h lang bei 37 °C mit 2% (M/V) Magermilchpulver in PBS blockiert. Nach weiteren drei Waschschritten wurden je 25 µL oder 50 µL der zu testenden Proben (Zellkulturüberstände, Pflanzenrohextrakte, verdünnte ghanaische Seren oder gereinigte Antikörper) aufgebracht. Als Negativkontrollen dienten stets die zur Verdünnung genommene Lösung (PBS oder B Zellmedium), Pflanzenrohextrakte nicht infiltrierter

Pflanzen und/ oder eine verdünnte Serummischung zweier malaria-naiver Spender. Als Positivkontrolle wurde stets eine Verdünnungsreihe (1:100 bis 1:3200) einer 1:1:1:1 Mischung aus vier ghanaischen Seren (0001, 0005, 0009 und 0026) genutzt. Nach 60 min Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Platten drei Male gewaschen und der 1:5000 in PBS verdünnte, AP-markierte Detektionsantikörper aufgetragen und erneut 60 min bei 37 °C inkubiert. Weitere fünf Waschschrte folgten bevor das Substrat, pNPP, hinzugegeben und dessen Umsatz nach 15-45 min (25 °C, in Dunkelheit) bei 405 nm ausgelesen wurde.

II.2.1.9. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)

Oberflächenplasmonresonanzmessungen dienten entweder (A) der Messung der Konzentration humanen IgGs in Überständen lymphoblastoider Zellen, (B) der Affinitätsbestimmung der generierten humanen Antikörper, (C) zur Konzentrationsmessung funktionalen Antikörpers ohne Kalibrierung (CFCA) oder (D, E) zur Eingrenzung des Epitops und der Funktionsweise des humAbAMA1. Die Messungen und Analysen für die Experimente B bis E wurden von Holger Spiegel durchgeführt.

(A) Zur Konzentrationsbestimmung humanen IgGs in Überständen lymphoblastoider Zellen wurde der bei Biacore/ GE Healthcare (Uppsala, Schweden) erhältliche, anti-humane IgG(Fc) Antikörper gemäß den Herstellerangaben auf einem CM5-rg Chip immobilisiert. Ein so funktionalisierter Chip vermag ausschließlich humanes IgG zu binden und nicht das im FKS des B Zellmediums enthaltene, bovine IgG. Die zu testenden Zellkulturüberstände wurden 1:5 in HBS-EP verdünnt. Unverbrauchtes, FKS-haltiges Medium wurde gleichermaßen verdünnt und diente in jeder Messreihe als Kontrolle. Ein humaner Referenzantikörper (H10 oder 2F5) wurde in Konzentrationen von 292 ng/mL bis 1,17 µg/mL zur Bestimmung von Referenzgeraden eingesetzt. Die Kontaktzeit der Proben mit dem Chip war 180 sec bei einer Flussrate von 30 µL/min. Die Oberfläche wurde nach jeder Einzelmessung mit 4 M MgCl₂ regeneriert. Es wurde ein Biacore T100 Instrument (Biacore) verwendet.

(B) Für die kinetischen Messungen der Affinitätsbestimmungen wurde ein Biacore T200 Gerät genutzt. Auf einem CM5-rg Chip wurde in der zweiten Flusskammer (Fc2) rekombinantes Protein-A durch eine EDC / NHS-Kopplung immobilisiert (250 µg/mL Protein-A in 10 mM Natriumacetat, pH 4,25, R_{immob} = 4500 RU). Die erste Flusskammer wurde nicht modifiziert. Die Antikörper und das Antigen wurden in HBS-EP verdünnt. Ein Messzyklus bestand dabei aus vier Schritten:

- (1) Bindung des Antikörpers, dessen Affinität bestimmt werden sollte. Die Menge des gefangenen Antikörpers wurde nicht variiert. Es wurden je 100-180 RU (Resonanzeinheiten) des zu testenden Antikörpers gebunden.
- (2) Bindung des Antigens. Hierzu wurde im Falle der MSP10-spezifischen humAbs monovalentes multi-PfEGF-his₆ und im Falle des AMA1-spezifischen humAbs verschiedene Varianten des AMA1 verwendet. Die Antigene wurden in jedem Zyklus in einer anderen Konzentration eingesetzt (0,1–540 nM) und mit einer Flussrate von 30 µL/min für 180 sec injiziert. Diese Phase diente der Bestimmung der Assoziationskonstanten, k_a [L · mol⁻¹ · sec⁻¹].

- (3) Spülen der Oberfläche mit HBS-EP, um den Grad der Dissoziation der Antigen-Antikörper Komplexe zu bestimmen. Diese Phase dauerte 600 sec und diente der Messung der Dissoziationskonstanten, k_d [sec^{-1}].
- (4) Regeneration der Oberfläche des Chips. Die Oberflächen wurden 60 sec mit 30 mM HCl regeneriert und somit für einen neuen Zyklus vorbereitet.

Die gewonnenen Messkurven wurden mithilfe des Programms „BIAEval 4.0“ analysiert. Die Messkurven der Flusskammer 1 wurden als Referenz verwendet und von den Messkurven der Kammer 2 subtrahiert. Mithilfe der so bestimmten k_a - und k_d -Werte lassen sich die individuellen Affinitätskonstanten K_D berechnen: $K_D = k_d / k_a$ [mol/L].

(C) Die Konzentration funktionalen Antikörpers humAbAMA1 wurde mithilfe einer kalibrierungsfreien Messung (CFCA) an einem Biacore T200 Gerät ermittelt.¹⁴ In *N. benthamiana* produziertes AMA1 wurde mittels EDC / NHS-Kopplung kovalent an die Oberfläche eines CM5-S Chips gekoppelt. Initiale Bindungsraten (IBR) des humAbAMA1 wurden mit Flussraten von 5, 20 und 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ bestimmt. Für das Modell zur Berechnung der Konzentration mithilfe der Software „BIAEval 4.0“ wurden ein Molekulargewicht von 150 kDa und ein Diffusionskoeffizient von $4,57 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{sec}$ angenommen. Die Regeneration des AMA1 Chips erfolgte jeweils mit 30 mM HCl für 60 sec.

(D) Zur Eingrenzung des Epitops des humAbAMA1 wurde dieser paarweise mit mAb1F9 oder mAb4G2 in Kompetitionsmessungen eingesetzt („pairwise epitope mapping“). Hierzu wurde ein CM5-S Chip mit einem AMA1-spezifischen Antikörper, mAb1D7, funktionalisiert.¹⁵ In jedem Zyklus wurde zunächst AMA1 gefangen (1750 RU; 180 sec Injektion). Anschließend wurden die Antikörper humAbAMA1, mAb1F9 oder mAb4G2 jeweils einzeln appliziert und der Chip wieder regeneriert. In Kompetitionsmessungen wurde zuerst humAbAMA1 gefangen und schließlich entweder mAb4G2 oder mAb1F9 injiziert. Die Regeneration am Ende jedes Zyklus erfolgte mit 30 mM HCl für 60 sec. Die Messungen wurden mit einem Biacore T200 Gerät durchgeführt.

(E) Um zu analysieren, ob humAbAMA1 und RON2 um die Bindung an AMA1 konkurrieren, wurde AMA1 3D7 zunächst in verschiedenen Verhältnissen mit RON2sp1 inkubiert (60 min, 25 °C). Dieses Peptid entspricht dem Teil des RON2, welcher von AMA1 gebunden wird (VULLIEZ-LE NORMAND *et al.*, 2012). HumAbAMA1 wurde in HBS-EP gelöst und über einen Protein-A-funktionalisierten Chip gefangen (400 RU). Anschließend wurden die AMA1:RON2sp1-Komplexe injiziert und deren Bindung an humAbAMA1 quantifiziert. Die Regeneration erfolgte mit 30 mM HCl für 60 sec.

II.2.1.10. Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur weiteren Untersuchung der Fähigkeit der generierten Antikörper ihre Zielstrukturen zu erkennen, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht. Es handelt sich hierbei um eine indirekte Färbung, da die humanen Antikörper über einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert wurden. Asynchron oder synchron kultivierte *P. falciparum* 3D7 wurden einmal in PBS gewaschen und in FKS, dessen bovines IgG stark abgereichert wurde, aufgenommen und zu je 8 μL auf geeigneten Objektträgern ausgestrichen. Nach Trocknung an der Luft wurden die parasitierten Erythrozyten in -20 °C kaltem Methanol 10 min lang fixiert. Die Färbung der Parasiten erfolgte nun entweder ausschließlich mit einem der anti-MSP10 Antikörper (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bzw. dem anti-AMA1

Antikörper (5 µg/mL), oder in Kombination mit Antikörper 2.44 (Maus anti-PfMSP4-EGF; 20 µg/mL) oder mAb5.2 (Maus anti-PfMSP1₁₉; 25 µg/mL) in IFA-Färbepuffer für 1 h bei 25 °C. Nach fünfmaligem Waschen in PBS wurden Hoechst (10 µg/mL) und die Sekundäntikörper (1:100 Ziege anti-murines IgG-Alexa Fluor 488 und/ oder 1:1000 Ziege anti-humanes IgG-Cy3) in IFA-Färbepuffer gelöst und die Objektträger darin 1 h unter Lichtausschluss inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten wurden die Objektträger kurz an der Luft getrocknet und schließlich mit Eindeckmedium („ProLong[®] Gold Antifade Reagent“, Life Technologies) und mit einem Deckgläschen versehen und handelsüblichem Nagellack versiegelt. Ein „Leica TCS SP8“ Mikroskop wurde genutzt, um Aufnahmen bei 630-facher Vergrößerung zu machen. Zur Bedienung des Mikroskops bzw. zur Bearbeitung und Analyse der Bilder dienten die Programme „LAS AF“ (Version 3.1.3) und „LAS AF Lite“ (Version 2.6.3_8173).¹⁶

II.2.1.11. Tryptischer Verdau im Gel und Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Analyse des rekombinant und natürlich exprimierten Antikörpers humAb10.3 wurde dieser mittels SDS-PAGE aufgetrennt, alkyliert, reduziert und tryptisch verdaut wie beschrieben (SHEVCHENKO *et al.*, 2006). Nach deren Entsalzung wurden die Peptide mittels „nanoHPLC“ (UltiMate 3000 HPLC System, Dionex, Idstein) und einem daran angeschlossenen „amaZon ETD MS“ Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) analysiert.¹⁷ Die HPLC erfolgte mit einer Umkehrphasematrix („PepMap 100“, LC Packings, Dionex, Idstein) und einem linearen Gradienten von 5,84% (V/V) Acetonitril in 0,1% (V/V) Ameisensäure bis 50% (V/V) Acetonitril in 0,1% (V/V) Ameisensäure über 45 min bei einer Flussrate von 40 nL/min. Die eluierten Peptide wurden mit einer Spannung von -4000 V und einem Gasdruck von 68,948 kPa versprüht. Das Massenspektrometer wurde im Elektrospray-Ionisationsmodus (ESI) verwendet; die Endplattenspannung wurde auf -500 V eingestellt. Für die Datenerhebung wurde die Methode „Auto-MS/MS (Alternating Spectra CID/ETD)“ des Programms „Trap Control 7.0“ (Bruker) genutzt. Die Rohdaten der massenspektrometrischen Messungen wurden mithilfe der Software „Compass Data Analysis“ Version 4.0-SR5 (Bruker), „Mascot Distiller 2.3.2.0“ und „Mascot Search 2.3.01“ (Matrix Science, London, Vereinigtes Königreich) analysiert.

II.2.2. Zellkultur und Parasitenkultur

In den folgenden Abschnitten wird die Kultur von *P. falciparum* und von eukaryotischen Zellen höherer Organismen beschrieben. Die Kultur und Handhabung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 95-100% Luftfeuchte. Im Fall der eukaryotischen Zelllinien/ -reihen¹⁸ betrug der Kohlendioxidpartialdruck $p_{\text{CO}_2} = 5\%$. Im Fall der Parasitenkultur betragen die Partialdrücke $p_{\text{CO}_2} = 5\%$, $p_{\text{N}_2} = 90\%$ und $p_{\text{O}_2} = 5\%$. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte i.d.R. mithilfe eines „Casy Cell Counters“. Sollte der Prozentsatz vitaler Zellen ermittelt werden, wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt und diese mikroskopisch analysiert (FRESHNEY, 2005). Die Parasitämie der *P. falciparum*-Kulturen wurde mithilfe von mit Giemsa gefärbten Ausstrichen (Abschnitt II.2.2.10.) und deren mikroskopischer Auswertung bestimmt.

II.2.2.1. Kultur der Zelllinien DG-75, Jurkat, Kasumi-1, Raji, Ramos und U-937

Die etablierten Zelllinien Ramos, Jurkat, Raji, U937, DG-75 und Kasumi-1 wurden in unterschiedlichen Medien kultiviert und zweimal in der Woche passagiert. Die folgende Tabelle fasst die Verdünnungsfaktoren und Medien zusammen.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Medien und Verdünnungsfaktoren für die etablierten Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Medium	Zelldichte nach Passage
DG-75	Burkitt Lymphom, human	R10	$0,5 \times 10^6$ Zellen/mL
Jurkat	Akute Lymphoblastische T Zelleukämie, human	R10	$0,5 \times 10^6$ Zellen/mL
Kasumi-1	Akute Myeloische Leukämie, human	R20	1×10^6 Zellen/mL
Raji	Burkitt Lymphom, human	R10	$0,5 \times 10^6$ Zellen/mL
Ramos	Burkitt Lymphom, human	R10	$0,8 \times 10^6$ Zellen/mL
U-937	Histiozytäres Lymphom, human	R10	$0,5 \times 10^6$ Zellen/mL

II.2.2.2. Kultur von B95-8 Zellen zur Gewinnung EBV-reicher Überstände

Zur Gewinnung infektiöser Epstein-Barr Viruspartikel wurde die Marmosettaffenzelllinie B95-8 verwendet (MILLER und LIPMAN, 1973). Hierzu wurde die Kultur mit einer initialen Dichte von 10^6 Zellen/mL in R10 Medium angesetzt und für vier bis elf Tage ohne den Austausch von Medium inkubiert. Die Ernte der Viruspartikel erfolgte durch Zentrifugation zur Entfernung von Zellen und Debris (800 xg, 10 min, 25 °C) und Filtration des Überstands durch sterile 0,45 µm-Filter. Anschließend wurden die infektiösen Überstände in Kryoröhrchen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C verwahrt.¹⁹

II.2.2.3. Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMCs)

Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts bestehen aus einer Mischpopulation von T Zellen, NK Zellen, B Zellen und Monozyten. Sie wurden isoliert, um (1) diese für die Bestimmung optimaler EBV Transformationsbedingungen zu verwenden (Abschnitt II.2.2.4.), (2) diese zu bestrahlen und als allogene Versorgerzellen in EBV Transformationen einzusetzen oder (3) sie aus dem Blut ghanaischer Spender zu isolieren,²⁰ einzufrieren und als Quelle antigenspezifischer B Zellen zu nutzen. Die ghanaischen Spender stammten aus Kumasi (Ashanti Region)²¹ und hatten mindestens zwei Jahre keine klinischen Anzeichen einer Malaria gezeigt.²²

Die Gewinnung von PBMCs erfolgte mit einer Methode, die der von ENGLISH und ANDERSEN (1974) ähnlich ist und sich einen Dichtegradienten zunutze macht. Für die Optimierung der Transformationsbedingungen und die Verwendung als Versorgerzellen wurden frische Buffycoat-Präparate von der Transfusionsmedizin der Uniklinik der RWTH Aachen University bezogen und bei 25 °C transportiert, um zellulärem Stress und lokalen Erfrierungen vorzubeugen. Der Buffycoat wurde mit zwei Volumen PBS (25 °C) gemischt und zu je 35 mL auf 15 mL Lymphozytenseparationsmedium mit einer Dichte von 1,077 g/mL (LSM1077) geschichtet und zentrifugiert (700 xg, 30 min, 25 °C, ohne Bremse). Die sich in der weißen Interphase zwischen LSM1077 (unten) und dem Plasma/ PBS-Gemisch (oben) befindlichen PBMCs wurden aufgesaugt, einmal in PBS gewaschen (400 xg,

8 min, 25 °C), einmal in R10 Medium gewaschen (300 xg, 10 min, 25 °C) und schließlich in 10 mL R10 Medium aufgenommen. Sofern die Zellen bestrahlt werden sollten, wurden sie auf die benötigte Zellzahl eingestellt und auf Eis aufbewahrt. Wenn die PBMCs direkt für eine Transformation eingesetzt werden sollten, wurden sie sofort verwendet. Die PBMCs ghanaischer Spender wurden in Kryomedium aufgenommen und mit einem Gradienten von 1 K/min bis -80 °C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff (-142 °C) transportiert und verwahrt.

II.2.2.4. Epstein-Barr Virus Transformation humaner peripherer B Zellen

EBV Transformationen von B Lymphozyten aus peripherem Blut wurden auf unterschiedliche Arten durchgeführt. Zum einen dienten sie zur Optimierung der Transformationsbedingungen. Zum anderen wurde diese Technik genutzt, um antigenspezifische B Zellen semi-immuner Spender zu infizieren, um lymphoblastoide Zelllinien/ -reihen zu gewinnen, die anti-plasmodiale Antikörper sezernieren.

Untersuchung der Parameter der EBV Transformation

Um eine bestmögliche Transformationseffizienz der B Lymphozyten semi-immuner Spender zu erzielen, wurden unterschiedliche Zelldichten, Medien, Zusätze und Versorgerzellen getestet. Hierzu wurden frische Buffycoat-Präparate von der Transfusionsmedizin der Uniklinik in Aachen bezogen, die PBMCs isoliert und diese mit 15,6% (V/V) B95-8 Zellkulturüberstand in Zellkulturplatten transformiert, die sich für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie eignen. Nach zwei Wochen wurden die Zellkulturüberstände auf ihren Gehalt an humanem IgG untersucht (Abschnitt II.2.1.9.) und die Zellen einer differentiellen Färbung unterworfen. Mithilfe von Calcein AM (5 µg/mL) und Propidiumjodid (5,78 µg/mL) konnte somit eine Quantifizierung der vitalen Zellaggregate, die typischerweise von lymphoblastoiden Zellen gebildet werden (AGUIRRE und ROBERTSON, 2000; HALDER *et al.*, 2009), mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht werden. Hierzu wurden die Zellen 30 min bei 37 °C gefärbt; schließlich wurden mithilfe eines Opera Mikroskops (Perkin Elmer) von jeder Vertiefung der Zellkulturplatten 70 Bilder bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurde ein 488 nm-Laser zur Anregung genutzt. Die Konfokalebene wurde auf 16 µm oberhalb des Bodens eingestellt, um zwischen Aggregaten und einzelnen, auf dem Boden des Napfs liegenden Zellen zu diskriminieren. Die Auswertung des Bildmaterials erfolgte mit Algorithmen des Programms Acapella (Perkin Elmer) und wurde von Stefano DiFiore durchgeführt.

Als Maß der Transformationseffizienz wurden zwei Kriterien herangezogen: (1) die Summe der Zellaggregate je Zellkulturnapf unter Berücksichtigung ihrer Größe (Summe der Clusterfläche²³) und die IgG Konzentration im Überstand (Abschnitt II.2.1.9.).

EBV Transformation nach FRAUSSEN *et al.* (2010)

Es stellte sich heraus, dass die für frisch isolierte B Zellen optimalen Transformationsbedingungen ungeeignet waren für kryokonservierte, antigenspezifisch sortierte B Zellen. Daher wurde die von FRAUSSEN *et al.* (2010) beschriebene EBV Transformationstechnik verwendet, wenngleich diese Methode keine antigenspezifische Sortierung der B Lymphozyten vorsieht. Die angereicherten IgG⁺ / CD22⁺ und IgG⁻ / CD22⁺ B Lymphozyten (Abschnitt II.2.1.7.) wurden einer Vitalfärbung mit Trypanblau unterworfen, um die Konzentration lebender Zellen zu ermitteln (FRESHNEY, 2005). Diese wurde mit frischem

R10HP Medium auf 10^3 /mL eingestellt und mit frisch aufgetautem B95-8 Überstand und CpG ODN 2006 versetzt. Volumen von 110 μ L dieser Suspension wurden nun zu je $2,5 \times 10^5$ Versorgerzellen in 90 μ L R10HP Medium gegeben, die bereits am Vortag bestrahlt und in 96-Napf-Rundbodenplatten vorgelegt worden waren. Der Prozentsatz des virushaltigen B95-8 Überstands betrug 30% (V/V), die Konzentration des CpG ODN 2006 1 μ g/mL. Nach zwei Wochen wurden 180 μ L des Überstands jedes Napfs durch 200 μ L R10HP Medium mit 1 μ g/mL CpG ODN 2006 und 50 U/mL rhIL-2 ersetzt. Nach weiteren ein bis vier Wochen²⁴ wurden die Überstände mittels ELISA (Abschnitt II.2.1.8.) auf Sekretion spezifischer Antikörper getestet. Ab diesem Punkt wurden bei unterschiedlichen Transformationen verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen kann man versuchen vielversprechende Zellen zu expandieren (Abschnitt II.2.2.5.). Diese Vorgehensweise wurde bei der ersten nach FRAUSSEN *et al.* (2010) durchgeführten Transformation verfolgt. Zum anderen bietet es sich an, frühestmöglich alle variablen Sequenzen zu sichern (Abschnitte II.2.3.2 und II.2.3.3.) und von einer zeit- und materialintensiven Expansion abzusehen, die darüber hinaus die Gefahr birgt, vielversprechende Klone zu verlieren.

II.2.2.5. Kultur und Expansion lymphoblastoider Zellen

Lymphoblastoide Zellaggregate frisch transformierter B Zellen wurden, sobald sie einen Durchmesser von mindestens 2-3 mm erreicht hatten, aus den Vertiefungen der 96-Napf-Rundbodenplatte genommen und je in eine Vertiefung einer 96-Napf-Flachbodenplatte transferiert. Nach und nach wurden diese Zellen, sofern möglich, erst auf zwei, dann auf vier Vertiefungen einer 96-Napf-Flachbodenplatte expandiert. Diese vier Minikulturen wurden nun in eine Vertiefung einer 24-Napf-Flachbodenplatte gegeben und wiederum erst auf zwei und schließlich auf vier Vertiefungen einer 24-Napf-Flachbodenplatte expandiert. Der nächste Schritt sah die Zusammenführung dieser vier Kulturen in einen Napf einer 6-Napf-Flachbodenplatte vor. Sofern die Zellen weiter proliferierten, wurden sie zunächst in einer T25-Flasche und schließlich in einer T75-Flasche kultiviert.

Generell wurden alle lymphoblastoiden Zellen in R10HP Medium (B Zellmedium) kultiviert und alle 3-4 Tage fünfmal pipettiert, um Zellaggregate zu zerkleinern.²⁵ Sofern nötig, wurde die Hälfte der Kultur durch neues, vorgewärmtes Medium ersetzt. Bei Kulturen mit schlechterer Proliferation wurde außerdem die gesamte Zellmasse in die Flasche zurückgeführt und die Hälfte des verbrauchten Mediums durch frisches ersetzt.

Sofern LCL Überstände gesammelt wurden, um daraus humanes IgG zu reinigen, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit 500 cm² Kulturfläche in R10HP kultiviert. Das R10HP Medium wurde in diesem Fall ohne Penicillin und Streptomycin angesetzt und enthielt FKS, dessen bovines IgG depletiert worden war. Die Überstände wurden zentrifugiert (300 xg, 5 min, 25 °C) und ohne Zellen und Debris bei -20 °C eingefroren.

II.2.2.6. Kryokonservierung lymphoblastoider Zellen

Lymphoblastoide Zellen wurden, sofern möglich, expandiert und eingefroren. Hierzu wurden je 5×10^7 LCLs in je 10 mL kaltem Kryomedium (4 °C) aufgenommen, mit einem Gradienten von 1 K/min bis -80 °C eingefroren und schließlich in Stickstoff (-142 °C) gelagert.

II.2.2.7. Kultur von *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum wurde in Malariazellkulturmedium (MCM) mit einem Hämatokrit (HT) von 5% (V/V) kultiviert (TRAGER und JENSEN, 1976). Die Parasitämie wurde stets auf 0,05-1% eingestellt und erreichte bis zur nächsten Passage maximal 5%.

II.2.2.8. Kryokonservierung und Auftauen von *Plasmodium falciparum*

Die Kryokonservierung von *P. falciparum*-Stämmen erfolgte mit 60-90 mL einer Kultur mit einer Parasitämie von mindestens $p_{\text{Ringe}} = 5\%$. Nach dem Abtrennen des Zellkulturüberstands (500 xg, 5 min, 25 °C, ohne Bremse), wurden je 1 mL parasitierte Erythrozyten mit 333 μL Glycerolyte aufgenommen, vorsichtig geschwenkt und 5 min bei 25 °C inkubiert. Nach vorsichtiger Zugabe weiterer 1,333 mL des Einfriermediums (Glycerolyte) wurden die Parasiten mit einem Gradienten von 1 K/min bis -80 °C eingefroren und anschließend in Stickstoff (-142 °C) aufbewahrt.

Zum Starten einer Kultur aus kryokonservierten, parasitierten Erythrozyten wurde diese in einem Wasserbad (37 °C) so lange unter vorsichtigem Schwenken angetaut bis etwa die Hälfte des Volumens noch gefroren war. Ein Volumen von 100 μL NaCl-Lösung (2 M, 4 °C) je 1 mL halbgefrorener Suspension wurde hinzugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei 25 °C wurden sukzessive 10 mL NaCl-Lösung (274 mM, 4 °C) hinzugefügt, die Erythrozyten abgetrennt (500 xg, 5 min, 25 °C, ohne Bremse), einmalig mit RPMI 1640 mit 25 mM HEPES gewaschen (500 xg, 5 min, 25 °C, ohne Bremse) und in 10 mL Kulturvolumen (5% Hkt in MCM) aufgenommen.

II.2.2.9. Präparation humaner Erythrozyten für die Parasitenkultur

Für das Erythrozytenkonzentrat wurden 12-24 CPDA-Röhrchen von rhesuspositiven Spendern mit Blutgruppe 0 von der Transfusionsmedizin der Uniklinik der RWTH Aachen bezogen. Diese Erythrozyten wurden gemischt, zentrifugiert (650 xg, 5 min, 25 °C, ohne Bremse) und das Plasma und weiße Blutkörperchen entfernt. Die roten Blutkörperchen wurden nun dreimal in SAG-Mannit gewaschen (650 xg, 5 min, 25 °C, ohne Bremse) und schließlich mit SAG-Mannit auf 66,67% Hkt eingestellt und bei 4 °C gelagert. Spätestens nach vier Wochen wurde neues Erythrozytenkonzentrat hergestellt.

II.2.2.10. Giemsa-Färbung

Um die Parasitämie der *P. falciparum*-Kulturen zu bestimmen, wurden dünne Ausstriche auf Objektträgern angefertigt. Nach der Trocknung an der Luft wurden diese 30 sec in 100% Methanol fixiert und 15 min in 0,02% (M/V) Giemsa in Phosphatpuffer gefärbt, unter Leitungswasser gewaschen, erneut an der Luft getrocknet und bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopisch ausgewertet.

II.2.2.11. Wachstumsinhibitionstests mit Plasmodien

Die Proliferation von Plasmodien kann grundsätzlich mit verschiedenen Methoden gemessen werden (BERGMANN-LEITNER *et al.*, 2006). Die hier gewählte Methode, die die Lebensfähigkeit/ Fitness miteinbezieht, basiert auf der im Nukleus lokalisierten plasmodialen

Laktatdehydrogenase (pLDH) (BERGMANN-LEITNER *et al.*, 2006; PERSSON, 2010). Die folgende Abbildung stellt die enzymatischen Reaktionen dar, die zur Bildung des Nachweisfarbstoffs, Nitroblau-Formazan, zur Quantifizierung funktionaler pLDH erforderlich sind.

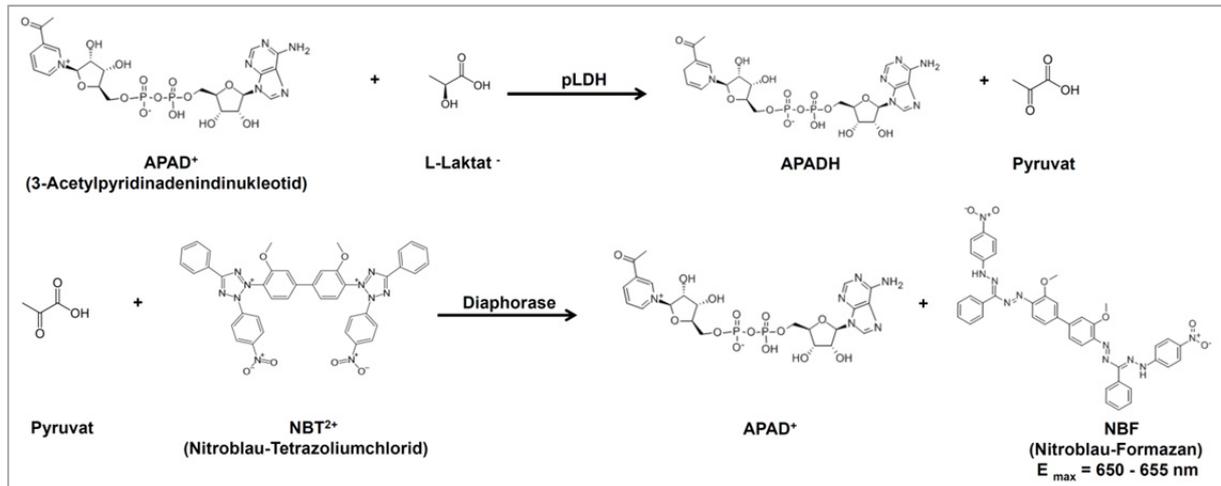


Abbildung 8: Darstellung der enzymatisch katalysierten Reaktionen zum quantitativen Nachweis der plasmodialen Laktatdehydrogenase. Im ersten Schritt setzt die plasmodiale Laktatdehydrogenase (pLDH) APAD und Laktat zu reduziertem APAD (APADH) und Pyruvat um. Im zweiten Schritt katalysiert Diaphorase die Reaktion von NBT und des entstehenden Pyruvats zu NBF und APAD. APAD wird somit recycelt und steht der ersten Reaktion wieder zur Verfügung. Die Menge des Edukts NBF ist proportional zur Menge des Pyruvats, das wiederum abhängig von den Einheiten funktionaler pLDH gebildet wird. Die Absorption des NBF kann bei einer Wellenlänge von 650-655 nm spektrophotometrisch ausgelesen werden.

Wachstumsinhibitionstests wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt (REMARQUE *et al.*, 2008a). *P. falciparum* wurde sieben, fünf und drei Tage vor Ansetzen des Tests mit wässriger Sorbitlösung (5% (V/V)) synchronisiert (RADFAR *et al.*, 2009), um den Test mit >85% Schizonten starten zu können. Die Parasiten wurden mit einer Parasitämie von 0,4% - 0,8%²⁶ in 2% (V/V) Hkt eingesetzt. Bei der Durchführung eines GIA sind mehrere Kontrollen durchzuführen. Hierzu zählen (1) nicht parasitierte Erythrozyten, parasitierte Erythrozyten (2) ohne Zusätze, (3) mit 4 mM EDTA, (4) mit 6 µg/µL polyklonalem Kaninchen anti-PfAMA1 IgG (BG98), (5) mit 6 µg/µL unspezifischem, polyklonalem Kaninchen-IgG, (6) mit 10 µg/µL unspezifischem, monoklonalem, rekombinant in *N. benthamiana* exprimiertem, humanem IgG (2G12).^{27, 28} Alle Antikörper wurden in RPMI 1640 mit 25 mM HEPES umgepuffert (Abschnitt II.2.5.3.). HumAb10.1, 10.2 und 10.3 wurden in finalen Konzentrationen von 1,25 bis 10 µg/µL eingesetzt. Der gegen AMA1 gerichtete humAbAMA1 wurde ausgehend von 10 µg/µL verdünnt bis zu einer Konzentration von 0,3 ng/µL. Nach 44-46 h wurden die Parasiten, die sich wiederum im Schizontenstadium befanden, geerntet: parasitierte Erythrozyten eines Napfs wurden einmal in je 200 µL kaltem PBS gewaschen (1300 xg, 10 min, 4 °C, ohne Bremse) und für mindestens 16 h bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen bei 37 °C, der Zugabe der GIA-Substratlösung und einer Inkubation bei 25 °C in Dunkelheit wurde die Extinktion bei 655 nm nach 30 min und nach 45 min ausgelesen. Der Prozentsatz der relativen Wachstumsinhibition wurde wie folgt berechnet: % Inhibition = 100 x [E_{655 nm} (Probe) - E_{655 nm} (RBK)] / [E_{655 nm} (Schizonten) - E_{655 nm} (RBK)], wobei es sich bei den Werten der Kontrollen um das arithmetische Mittel zusammengehöriger Werte handelte. Die Erythrozyten- und Schizontenkontrollen wurde je im Sechsfachansatz bestimmt. Die Auswertung der Daten und die Bestimmung von EC₅₀-Werten

und entsprechenden Konfidenzintervallen wurde mithilfe des Programm „GraphPad Prism“ und dessen Algorithmus „log(agonist) vs. normalized response“ durchgeführt.²⁹

Zur Untersuchung etwaiger synergistischer Effekte wurden die Antikörper humAb10.1 und humAbAMA1 in Kombination eingesetzt, und zwar proportional zu ihren EC₅₀-Werten in Verhältnissen von 1:1, 1,5:1, 4:1, 1:2 und 1:4. Die Auswertung erfolgte mithilfe eines EC₅₀-Isobologramms und der Berechnung des Synergismusmaßes „HEWLETTs *S*“ (WILLIAMS *et al.*, 2012; GRECO *et al.*, 1995).

II.2.3. Molekularbiologische Methoden

Grundsätzlich wurden die gängigen molekularbiologischen Arbeitsschritte, wie etwa Plasmidisolationen, Restriktionsverdau, Ligationen, Hitzeschocktransformationen, Kolonien-PCRs und Agarosegelelektrophorese, durchgeführt wie in relevanter Literatur beschrieben (SAMBROOK und RUSSELL, 2001). Im Folgenden wird daher nur auf Besonderheiten dieser Arbeit eingegangen. Zur Sicherung und Klonierung der variablen Immunglobulinbereiche aus jenen Zellen, die in Maastricht transformiert wurden, trugen Melanie Seidel und Susanne Bethke bei. Michael Krolik half bei der zielgerichteten Mutagenese und Klonierung der gesicherten V_H-, V_κ- und V_λ-Sequenzen aus lymphoblastoiden Zellen der zweiten Transformation, welche in Aachen durchgeführt worden war.

II.2.3.1. Gewinnung von mRNA und genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA aus Ramos Zellen, PBMCs und lymphoblastoiden Zellreihen erfolgte mithilfe des Kits „NucleoSpin Tissue“ (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben. MessengerRNA aus lymphoblastoiden Zellen wurde mit den Baukastensystemen „NucleoSpin RNA II“ (Macherey und Nagel) oder „RNeasy Plus Mini“ (Qiagen) gemäß den Herstelleranweisungen gewonnen und bei -80 °C aufbewahrt.

II.2.3.2. Reverse Transkription der mRNA

Zur Herstellung von cDNA/ Erststrangsyntheseprodukten aus lymphoblastoiden Zellen wurden zwei Kits genutzt: „SuperScript[®] III“ oder „SuperScript[®] III CellsDirect“ (Life Technologies). Welches verwendet wurde, hing von der verfügbaren Zellmasse ab. Waren mehr als 10⁶ Zellen zur mRNA-Gewinnung vorhanden, wurde zuerst mRNA isoliert und diese mithilfe des erstgenannten Kits zu cDNA weiterverarbeitet. Waren hingegen nur wenige Zellen verfügbar, wie bei einzelnen B Zellclustern, wurde das CellsDirect Kit genutzt, das keine separate mRNA-Isolation erfordert. Es wurden in beiden Fällen die Randomhexameroligonukleotide genutzt.

II.2.3.3. PCRs zur Sicherung der variablen Immunglobulinsequenzen humaner lymphoblastoider Zellen

Die Sicherung der Sequenzen der variablen Bereiche der humanen schweren und leichten Ketten aus lymphoblastoiden Zellreihen erfolgte angelehnt an das von TILLER *et al.* (2008) publizierte Protokoll. Dieses ist zur Sicherung der V_H-, V_κ- und V_λ-Sequenzen einzelner

B Lymphozyten gedacht und sieht mehrere separate Oligonukleotidmischungen für die schweren bzw. die κ und λ leichten Ketten vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die PCRs für die in Maastricht transformierten LCLs nach den Angaben von TILLER *et al.* (2008) durchgeführt. Für die Amplifikation der variablen Bereiche der LCLs, die in Aachen transformiert wurden, wurde das Protokoll in fünf Punkten abgeändert. Erstens wurde das TILLER Primerset um die in Tabelle 6 aufgeführten Oligonukleotide erweitert. Zweitens wurden die ersten Reaktionen jeweils nur mit einem korrespondierenden Primerpaar durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit der spezifischen Amplifikation seltener oder schwerer zu vervielfältigender Sequenzen zu erhöhen. Drittens wurden hierbei die Anlagerungstemperaturen und Extensionszeiten individuell angepasst. Viertens wurde eine Reamplifikationsrunde eingeführt, die mit Primermischungen angesetzt wurde und so durchgeführt wurde, wie es das Protokoll von TILLER für die ihre erste Amplifikation vorsah. Diese PCR-Produkte wurden i.d.R. in TopoVektoren kloniert (Abschnitt II.2.3.4.), um zum einen endogen vorhandene *Age* I-, *Sal* I-, *Bsi* WI- oder *Xho* I-Schnittstellen ausmerzen zu können (Abschnitt II.2.3.6.) und zum anderen, um ggf. nicht degenerierte, besser passende Primer (siehe Tabelle 6) für die letzte PCR verwenden zu können. Die fünfte Änderung bezieht sich daher auf die individuelle Anpassung der Bedingungen für diese verschachtelte PCR. Abbildung 9 veranschaulicht die Strategie.

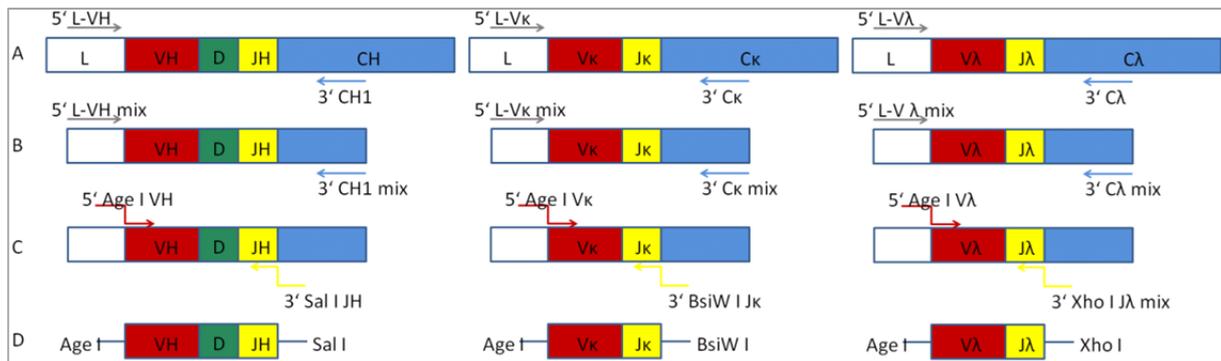


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Strategie der verschachtelten PCRs zur Sicherung der variablen Sequenzen humaner Antikörper aus lymphoblastoiden Zellreihen. A: cDNS; B: Produkt der ersten PCR; C: Produkt der Reamplifikation; D: Produkt der verschachtelten PCR. Darstellung in Anlehnung an TILLER *et al.* (2008), Abbildung 1.

II.2.3.4. Klonierung der variablen Bereiche humaner Antikörper

Die gesicherten variablen Sequenzen wurden i.d.R. zuerst in TopoVektoren kloniert und anschließend über die passenden Schnittstellen in pTRAkt_IgG1_H, pTRAkt_Ig κ , oder pTRAkt_Ig λ eingebracht.

Klonierung in kommerzielle TopoVektoren

In den Fällen, in denen es sich als schwierig erwies die V_H -, V_κ - und V_λ -Sequenzen direkt in pTRAkt zu klonieren, wurden die Produkte der Reamplifikations-PCRs in TopoVektoren (pCR II Topo) eingebracht. Um 3'-Überhänge von je einem Adenin zu erzeugen, wurden die PCR-Reaktionen 10 min bei 72 °C mit konventioneller Taq inkubiert. Ein Volumen von 4 μ L jedes PCR-Produkts wurde nun mit je 1 μ L Vektor und 1 μ L Salzlösung versetzt und 30 min bei 25 °C inkubiert. Die hitzeschocktransformierten *E. coli* DH5 α wurden schließlich auf Ampicillin-LB-Agar-Platten mit IPTG und X-Gal (je 4 μ mol/Platte) ausgestrichen, um eine

Blau/ Weiß-Selektion zu ermöglichen (DONG *et al.*, 1999). Je Klonierung wurden 20-30 weiße Klone für eine Kolonien-PCR ausgesucht. Bei richtiger Produktgröße wurden die TopoVektoren isoliert und vom hausinternen Service sequenziert (Abteilung Funktionelle und Angewandte Genomik, Fraunhofer IME, Aachen).

Klonierung in pTRAkt-Expressionsvektoren

Vektoren und Amplifikate wurden mit *Age* I und einem zweiten Enzym (*Sal* I, *Bsi* WI oder *Xho* I) nach Herstellerangaben verdaut und Fragmente der richtigen Größe gereinigt („NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit, Macherey und Nagel). Die humanen V_H-, V_K- und V_λ-Sequenzen wurden nun über Nacht in passende pTRAkt-Vektoren ligiert. Hierzu wurde ein molares Vektor- zu Insertverhältnis von 1:8 gewählt und die T4 Ligase (NEB) benutzt. Je Klonierung wurden 5-10 Klone für eine Kolonien-PCR genutzt. Bei richtiger Insertgröße wurden die pTRAkt-Vektoren zum Sequenzieren gegeben.

II.2.3.5. Analyse der Klonalität lymphoblastoider Zellreihen mittels Spekatratyping

Um die Klonalität der lymphoblastoiden Zellreihen (II.2.2.4.) zu untersuchen, wurde genomische DNS isoliert und für drei Multiplex-PCRs verwendet. Die Oligonukleotide sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Als monoklonale Kontrolle diente gDNS von Ramos Zellen. Genomische DNS von PBMCs wurde als polyklonale Kontrolle verwendet. Die PCR-Zyklen waren: Denaturierung (95 °C, 7 min), 35 Amplifikationsrunden (Denaturierung 94 °C, 60 sec; Anlagerung 60 °C, 45 sec; Verlängerung 72 °C, 90 sec) und eine finale Verlängerung (72 °C, 10 min). Die Auftrennung erfolgte mit einem „3730 DNA Analyser“ (Applied Biosystems).³⁰ Produkte der ersten Reaktion sollten 310-360 bp groß sein, solche der zweiten 250-295 bp und solche der dritten 100-170 bp. Polyklonale Populationen sollten mit jedem Reaktionsmix mehrere Signale zeigen, monoklonale hingegen je nur eines (VAN DONGEN *et al.*, 2003; FRAUSSEN *et al.*, 2010).

II.2.3.6. Mutagenese der variablen Bereiche humaner Antikörper

In einigen Fällen war es notwendig endogene Restriktionsschnittstellen zu entfernen, um eine Klonierung in die Expressionsvektoren zu ermöglichen. Hierzu wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt (WEINER *et al.*, 1994; WEINER und COSTA, 1994). Die Primer wurden so entworfen, dass nur eine Base ausgetauscht werden musste, sodass die Aminosäureabfolge dieselbe blieb und kein seltenes Kodon eingeführt wurde. Für die PCR wurden je 26 ng Vektor, 62,5 ng jedes Primers und das „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche) genutzt. Die PCR-Zyklen waren folgende: Denaturierung (95 °C, 5 min), zwölf Amplifikationsrunden (Denaturierung 95 °C, 60 sec; Anlagerung 55 °C, 60 sec; Verlängerung 68 °C, 5 min 30 sec) und eine finale Verlängerung (68 °C, 20 min). Nach dem *Dpn* I-Verdau (37 °C, 2 h) der methylierten Mutterstränge wurden *E. coli* DH5α hitzeschocktransformiert. Je Transformation wurden 30 Kolonien für eine Kolonien-PCR ausgesucht. Bei richtiger Produktgröße wurden diese 1 h mit dem Enzym inkubiert, dessen Schnittstelle entfernt werden sollte. Bei Abwesenheit zweier Fragmente wurden die entsprechenden reparierten TopoVektoren sequenziert und für weitere PCRs genutzt.

II.2.4. Mikrobiologische Methoden

Chemikompetente *E. coli* DH5 α wurde nach Standardmethoden bereit, hitzeschocktransformiert, kultiviert und kryokonserviert (SAMBROOK und RUSSELL, 2001). Die entsprechenden Techniken für *A. tumefaciens* (*Rh. radiobacter*) sind im Folgenden beschrieben.

II.2.4.1. Bereitung elektrokompetenter *A. tumefaciens*

Ein Volumen von 500 mL YEB-Medium mit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rifampicin wurde mit einer Vorkultur von *A. tumefaciens* (Stamm GV3101 mit Plasmid pMP90RK) inokuliert und in einem 2 L-Erlenmeyerkolben bis zu einer OD_{600 nm} von 5,0 bei 28 °C und 160 rpm inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (4566 xg, 10 min, 4 °C) und die Zellmasse zweimal in eiskaltem, sterilem, deionisiertem Wasser und dann einmal in eiskaltem, sterilem Glycerin (10% (V/V) in deionisiertem Wasser) gewaschen (4566 xg, 10 min, 4 °C). Die Bakterien wurden in 3 mL eiskaltem, sterilem 10% (V/V) Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

II.2.4.2. Transformation von *A. tumefaciens*

Elektrokompetente *A. tumefaciens* wurden auf Eis aufgetaut und zu je 50 μL in eiskalten 2 mm-Küvetten 5 msec bei 2500 V transformiert (FAZEKAS *et al.*, 1963; LIN, 1995). Die Regeneration erfolgte für 2 h bei 28 °C, 160 rpm in SOC-Medium. Volumina von 10 μL wurden auf YEB-Selektionsplatten (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Carbenicillin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rifampicin) ausgestrichen und für fünf Tage bei 28 °C inkubiert. Erfolgreich transformierte Klone wurden mittels Kolonien-PCR identifiziert.

II.2.4.3. Kultur von *A. tumefaciens*

Die Kultur und Expansion von transformierten *A. tumefaciens* für die Infiltration von *N. benthamiana* (Abschnitt II.2.5.1.) erfolgte in YEB-Medium mit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Carbenicillin in Erlenmeyerkolben bei 28 °C, 160 rpm.

II.2.4.4. Kryokonservierung von *A. tumefaciens*

Zur Kryokonservierung wurde eine *A. tumefaciens*-Kolonie in YEB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Carbenicillin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin angezogen und mit einer OD_{600 nm} von 20 in 30% (V/V) Glycerin in YEB-Medium aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

II.2.5. Expression humaner Antikörper in *N. benthamiana*

II.2.5.1. Infiltration und transiente Transfektion von *N. benthamiana*

Für jede Produktion humaner Volllängenantikörper in *N. benthamiana* wurden drei *A. tumefaciens*-Kulturen angezogen und kombiniert: je eine für die schwere und die leichte Immunglobulinkette und eine mit *A. tumefaciens*, die das Plasmid pTRAc-p19si trug, welches für den Silencinginhibitor p19 kodiert (FELLER *et al.*, 2013). Die OD_{600 nm}-Werte jeder Kultur wurden mit Wasser auf 2,0 eingestellt. Je zwei Teile der Suspensionen mit *A. tumefaciens* für die schwere und die leichte Antikörperkette und ein Teil der Suspension

mit *A. tumefaciens* pTRAc-p19si wurden gemischt, 1:2 in 2X Infiltrationsmedium verdünnt und mit 200 µM Acetosyringon für mindestens 1 h bei 25 °C inkubiert.

Zu Testexpressionszwecken wurden einige Blätter sechs bis acht Wochen alter *N. benthamiana*-Pflanzen mit einer Spritze infiltriert. Für die Produktion in größerem Maßstab wurden die Agrobakterien per Vakuuminfiltration (5 kPa, 25 °C, 1 min) in die Pflanzen eingebracht. Bei Testexpressionen halfen Susanne Bethke, Melanie Seidel und Michael Krolik.

II.2.5.2. Kultur und Ernte der infiltrierten Pflanzen

Zur testweisen Expression wurden die Pflanzen aufrecht stehend für vier bis sechs Tage unter Dauerlicht kultiviert. Diese Pflanzen wurden nach Bedarf gegossen, jedoch niemals so, dass Staunässe entstand oder das Steinwollesubstrat vollständig austrocknete. Nach der Ernte wurden die Blätter gewogen und mit 200-300 mL eiskaltem Extraktionspuffer je 100 g Blättern in Stickstoff gemörsert. Nach Zentrifugation (11000 xg, 5 min, 4 °C) wurden die Überstände direkt für ELISA, Dotblots und SDS-PAGE eingesetzt.

Bei Proteinexpressionen im größeren Maßstab (6-24 Pflanzen) wurden die infiltrierten Pflanzen für fünf Tage über Kopf hängend unter weißem Dauerlicht und regelmäßiger Bewässerung kultiviert. Für die Ernte wurden sie gewogen und für 2 min in 200-300 mL eiskaltem Extraktionspuffer je 100 g Blättern in einem Standmixer zerkleinert. Fasern und gröbere Pflanzenteile wurden durch Filtration mit Miracloth entfernt. Danach wurden 500 mM NaCl zugegeben und der pH Wert auf 8,2 eingestellt. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurde partikuläres Material durch Zentrifugation (17000 xg, 30 min, 4 °C) und Filtration (0,45 µm) entfernt.

II.2.5.3. Reinigung humaner Antikörper aus Zellkulturüberständen und aus *N. benthamiana*

Humanes IgG aus *N. benthamiana*-Pflanzenextrakten und aus lymphoblastoiden Zellkulturüberständen wurde mittels Protein-A-Chromatographie gereinigt. Hierzu wurde eine Protein-A-Keramikmatrix („Protein A Ceramic HyperD“, PALL) mit Protein-A-Chromatographie Bindungs-/ Waschpuffer äquilibriert und die Matrix über Nacht bei 4 °C mit dem Extrakt / dem Überstand inkubiert. Nach dem Waschen mit 20-30 Säulenvolumen Protein-A-Chromatographie Bindungs-/ Waschpuffer wurde das IgG in 1,34 mL-Fractionen mit Protein-A-Chromatographie Elutionslösung eluiert, die Lösungen mit je 660 µL Protein-A-Chromatographie Neutralisierungspuffer neutralisiert und über Nacht in PBS (4 °C) dialysiert. Die Membran hatte eine Ausschlussgröße von 6-8 kDa. Zur Vorbereitung auf Wachstumsinhibitionstests wurden die Antikörper konzentriert und in RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES überführt. Hierzu wurden Konzentratorsäulchen verwendet („Vivaspin VS15RH21“ (Sartorius Stedim), Ausschlussgröße 30 kDa), die zunächst drei Male mit PBS gewaschen wurden, um Schwermetalle und andere Produktionsrückstände aus der Membran zu entfernen. Bei 3000 xg wurden die Antikörperlösungen nun konzentriert, drei Male in RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES gewaschen und schließlich in diesem Medium auf die angestrebte Konzentration eingestellt. Die konzentrierten Antikörper wurden nun sterilfiltriert (0,22 µm-Filter, PES Membran) und bis zum Ansetzen des GIA bei -20 °C aufbewahrt.

II.2.5.4. Analytische Gelfiltration

Zur Untersuchung der Integrität der gereinigten Antikörper wurden analytische Gelfiltrationen durchgeführt. Hierzu wurde eine „Superdex 200“-Säule (GE Healthcare) mit 22,23 mL Bettvolumen verwendet, welche für Proteine zwischen 10 kDa und 600 kDa Größe geeignet ist. Die Antikörper wurden mit einer Flussrate von 0,5 mL/min in PBS aufgetrennt³¹ und das Chromatogramm hinsichtlich der Größenverteilung der eluierten Proteine analysiert. Als Referenz dienten Messungen mit einem kommerziellen humanisierten monoklonalen Antikörper, Omalizumab (Novartis).

II.2.6. Expression und Reinigung rekombinanter plasmodialer Antigene

Neben den Antikörpern wurde auch das Protein multi-PfEGF-his₆ in *N. benthamiana* produziert. *A. tumefaciens* mit dem Plasmid pTRAc_EGFs_ERH (1_19-1_8-2_8-4-1_10-2_10aglyc) wurde von Alexander Boes zur Verfügung gestellt und wie unter Abschnitt II.2.4.3. beschrieben kultiviert und expandiert. Zeitgleich wurde eine Kultur von *A. tumefaciens* angezogen, welche das Plasmid pTRAc-p19si tragen. Die Vorbereitung der Bakteriensuspensionen für die Infiltration erfolgte wie zuvor (Abschnitt II.2.5.1.). Eine Menge von 28 *N. benthamiana*-Pflanzen (zwölf neun Wochen alte und sechzehn acht Wochen alte) wurde infiltriert und für fünf Tage kultiviert (Abschnitt II.2.5.2.). Der zur Zerkleinerung der Pflanzen verwendete Extraktionspuffer wurde aufgrund der Kälteempfindlichkeit des Zielproteins nicht gekühlt und enthielt darüber hinaus kein Natriumdisulfit. Nach Filtration durch Miracloth und der Zugabe von 500 mM NaCl wurde der pH auf 8,0 eingestellt. Drei weitere Reinigungsschritte folgten: eine kontinuierliche Zentrifugation bei 33000 rpm, eine Tiefenfiltration („Supracap PDH 10 inch“ (Sartorius Stedim)) und eine weitere Filtration zur Entfernung von Partikeln von über 0,45 µm Durchmesser. Es schloss sich eine Ni²⁺-IMAC (Chelating Sepharose (GE Healthcare)) an. Die Matrix wurde mit PBS äquilibriert und mit einer Flussrate von 15 mL/min beladen. Nach dem Waschen mit PBS (20 mL/min) wurde das Zielprotein mit 250 mM Imidazol in PBS (pH 7,4) eluiert, mittels Dialyse gegen PBS (über Nacht bei 4 °C, Ausschlussgröße von 6-8 kDa) entsalzt, sterilfiltriert (0,22 µm, PVDF Filter) und bei 4 °C gelagert.³²

III. Ergebnisse

III.1. EBV Transformation

III.1.1. Optimierung der EBV Transformation

Vor dem Hintergrund der Zielsetzung der Generierung humaner monoklonaler Antikörper aus B Zellen kryokonservierter PBMCs semi-immuner Spender galt es zunächst eine EBV Transformationsmethode zu entwickeln und zu etablieren, die eine hohe Transformationseffizienz aufweist. Dies war vor allem vor dem Hintergrund notwendig, dass von jedem Spender nur eine begrenzte Menge PBMCs zu Verfügung stand. Darüber hinaus nimmt der Prozentsatz lebensfähiger PBMCs bei der Kryokonservierung – wie sie für die Sicherung und Aufbewahrung der Zellproben aus Ghana und Madagaskar notwendig ist – und dem Auftauen ab. Außerdem kann angenommen werden, dass der Anteil von Gedächtnis B Zellen im peripheren Blut, die sich gegen ein bestimmtes Malariaantigen richten, bei schätzungsweise lediglich ca. 9 bis 24 Zellen je einer Million PBMCs liegt.³³ Neben der Maßgabe einer hohen Transformationseffizienz müssen die transformierten lymphoblastoiden Zellen (LCLs) außerdem Antikörper sezernieren, damit sie mittels ELISA als vielversprechend identifiziert werden können.

Die Darstellung der Ergebnisse der Hochdurchsatzscreenings der EBV Transformationsbedingungen mithilfe der automatisierten konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt II.2.2.4.) und der Analyse der humanen IgG Konzentration in den Zellkulturüberständen (Abschnitt II.2.1.9.) erfolgt an dieser Stelle exemplarisch. In Abbildung 10 ist die Transformationseffizienz und die IgG-Sekretion frisch transformierter LCLs in Abhängigkeit RPMI 1640- und DMEM-basierten Mediums und zweier Additive, humanen holo-Transferrins und CpG ODN 2006, dargestellt. Es zeigte sich, dass – sofern kein CpG ODN 2006 hinzugegeben wurde – DMEM- und RPMI 1640-basierte Medien zu ähnlichen Transformationsraten führten. Bei Anwesenheit des TLR9-Liganden CpG ODN 2006 jedoch führte das DMEM-basierte Medium zu einer höheren Transformationsrate. Das humane holo-Transferrin zeigte keinerlei signifikanten Einfluss auf die Transformationseffizienz. Bezüglich der Sekretion humanen IgGs führte DMEM-basiertes im Vergleich zu RPMI 1640-basiertem Medium bei allen Ansätzen zu einer höheren IgG Konzentration im Zellkulturüberstand; der IgG Gehalt war um den Faktor 4,3 bis 29,4 höher. Es zeigte sich außerdem, dass bei DMEM-basiertem Medium sowohl die Zugabe von CpG ODN 2006 als auch die des holo-Transferrins einen positiven Einfluss auf die IgG-Sekretion zu haben schienen. Die höchste IgG-Konzentration lag hier bei 3,5 mg/L bei gleichzeitiger Zugabe beider genannter Additive.

Im vorangegangenen Experiment wurden die PBMCs zu je 100.000 Zellen pro Vertiefung ohne weitere, bestrahlte Versorgerzellen transformiert. Die antigenspezifischen B Zellen der semi-immunen Spender jedoch hätten nicht in einer so hohen Zelldichte transformiert werden können, sondern mit lediglich 50 Zellen je Napf. Es bestand daher die Notwendigkeit des Einsatzes von Versorgerzellen. Häufig werden hierzu PBMCs eines anderen Spenders genutzt, allerdings ist die Verwendung dieser aus unterschiedlichen

Gesichtspunkten nachteilig.³⁴ Es wurden daher verschiedene, etablierte Standardzelllinien als Versorgerzellen getestet.

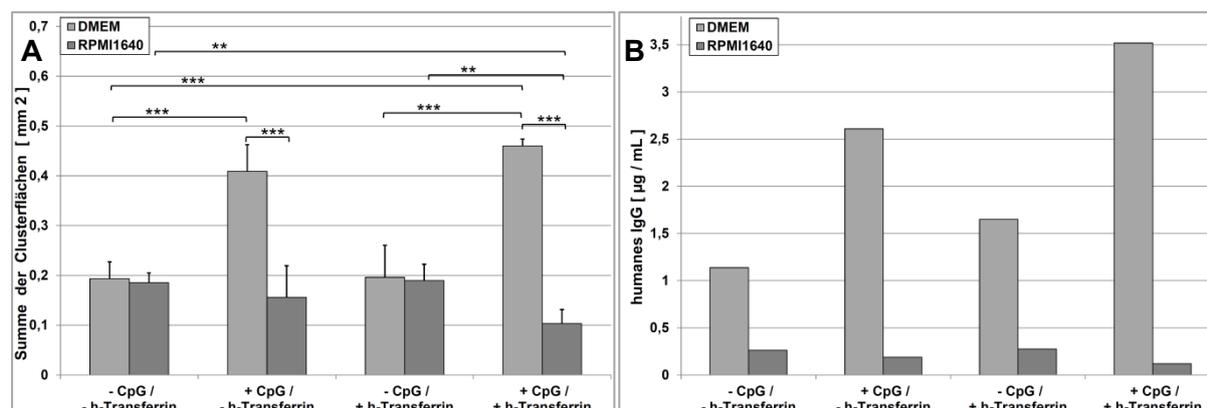


Abbildung 10: Untersuchung der Bildung von Zellaggregaten (A) und der Sekretion humanen IgGs (B) von lymphoblastoiden Zellen in Abhängigkeit unterschiedlichen Mediums und der Anwesenheit der Zusätze CpG ODN 2006 und humanen holo-Transferrins. Je 100.000 frisch präparierte PBMCs wurden je Napf einer 96-Napfplatte entweder in DMEM- oder RPMI 1640-basiertem Medium in Gegenwart von 2 µg/mL Cyclosporin A und 15,6% (V/V) EBV-haltigen Überstands transformiert (II.2.2.4.). Als Zusätze wurden ggf. 2,5 µg/mL CpG ODN 2006 und/ oder 80 ng/mL holo-Transferrin verwendet. Es handelt sich hierbei um Quadruplikate. Zwei Wochen nach der Infektion mit EBV wurden die Zellen einer Vitalfärbung (Calcein AM) unterworfen und die Überstände auf ihren IgG-Gehalt getestet. (A) Mithilfe eines Opera Konfokalmikroskops wurden 35 Bilder je Napf aufgenommen (II.2.2.4.). Die zusammengesetzten Bilder wurden schließlich über ein Bildauswerteprogramm (Acapella) ausgewertet. Hierzu wurde Algorithmus A genutzt und die Clusterausschlussgröße auf 200 Pixel² (90,9 µm²) festgesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Summen der Calcein-gefärbten Clusterflächen in mm². Unterschiede wurden mithilfe eines paarweisen, zweiseitigen t-Tests untersucht. Sofern keine Signifikanzniveaus angegeben sind, lag der jeweilige Wert oberhalb von 0,05 oder wurde nicht berechnet, bspw. im Fall nicht direkt vergleichbarer Stichproben. ,***' : p < 0,01; ,****' : p < 0,001. (B) Die Quantifizierung des humanen IgG erfolgte mithilfe von Oberflächenplasmonresonanzmessungen (II.2.1.9.). Standardabweichungen können nicht ermittelt werden, da es sich um Einfachmessungen jeweils vier einander entsprechender, zusammengeführter Überstände handelt.

Hierzu zählen DG-75, Jurkat, Kasumi-1, Ramos, Raji und U-937, die mit einer Dosis von 30 Gray bestrahlt und mit 200.000 oder 400.000 Zellen je Napf testweise eingesetzt wurden. Es wurden 50.000 frische PBMCs darauf gebettet, die je ca. 1.700 CD19⁺ B Zellen enthielten. Mit Kasumi-1 und DG-75 Zellen zeigten sich die höchsten Transformationsraten, daher wurden diese jeweils in DMEM-basiertem Medium und mit oder ohne CpG ODN 2006 in einem weiteren Experiment eingesetzt (Abbildung 11). Ohne Zugabe von CpG ODN 2006 führten Kasumi-1 Zellen bei beiden Zelldichten zu einer höheren Transformationsrate als DG-75 Zellen bei jeweils vergleichbaren Dichten. Mit CpG ODN 2006 war unklar, ob Kasumi-1 geeigneter sind, denn bei 400.000 Versorgerzellen je Napf zeigt sich nun bei DG-75 Zellen die höhere Transformationsrate. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen ist nicht eindeutig festzustellen, welche Art und welche Dichte von Versorgerzellen gewählt werden sollte. Wirft man jedoch einen Blick auf das humane IgG in den Überständen (Abbildung 11(B)), so wird klar, dass kein IgG sezerniert wurde, wenn DG-75 als Versorgerzellen eingesetzt wurden, und dass bei Kasumi-1 eine Dichte von 200.000 Zellen je Napf optimal erschien.

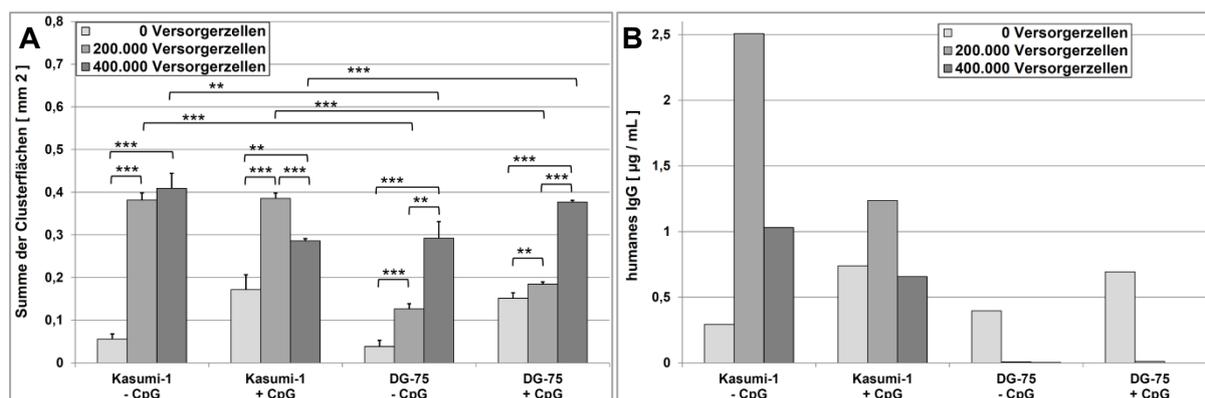


Abbildung 11: Transformationseffizienz (A) und Antikörpersekretion (B) frischer B Lymphozyten in Abhängigkeit unterschiedlicher Versorgerzellen und CpG ODN 2006. Die Transformation wurde in DMEM-basierten Medium durchgeführt. Es wurden 40.000 frisch präparierte Die Transformation wurde in DMEM-basierten Medium durchgeführt (II.2.2.4.). Es wurden 40.000 frisch präparierte PBMCs, die ca. 1.380 B Zellen enthielten, je Vertiefung einer 96-Napfplatte verwendet. Als Versorgerzellen wurden bestrahlte Kasumi-1 Zellen oder DG-75 Zellen eingesetzt. CpG ODN 2006 und Cyclosporin A wurden in Konzentrationen von 2,5 µg/mL bzw. 2 µg/mL verwendet. Der Anteil des EBV-haltigen Überstands betrug 15,6% (V/V). (A) Zwei Wochen nach der Infektion wurden die Summen der Clusterflächen je Napf bestimmt wie unter Abschnitt II.2.2.4. beschrieben. Zur Auswertung des Bildmaterials diente der Acapella Algorithmus B; die Clusterausschlussgröße entsprach 200 Pixel² (90,9 µm²). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Summen der Calcein-gefärbten Clusterflächen in mm². Unterschiede wurden mithilfe eines paarweisen, zweiseitigen t-Tests untersucht. Sofern keine Signifikanzniveaus angegeben sind, lag der jeweilige Wert oberhalb von 0,05 oder wurde nicht berechnet, bspw. im Fall nicht direkt vergleichbarer Stichproben. ,**‘ : p < 0,01; ,***‘ : p < 0,001. (B) Neben der Vitalfärbung wurden Überstände aus den sich jeweils entsprechenden Näpfen entnommen und zu gleichen Anteilen gemischt. Die Quantifizierung des humanen IgGs erfolgte mithilfe von Oberflächenplasmonresonanzmessungen (II.2.1.9.). Standardabweichungen können nicht ermittelt werden, da es sich um Einfachbestimmungen jeweils vier einander entsprechender, zusammengeführter Überstände handelt.

III.1.2. EBV Transformation von B Lymphozyten semi-immuner Spender

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, zeigte das Hochdurchsatzscreening der EBV Transformationsbedingungen, dass DMEM-basiertes Medium und Kasumi-1 Versorgerzellen besonders geeignet erschienen, um eine hohe Transformationsrate zu erzielen. Folglich wurden die kryokonservierten PBMCs semi-immuner Spender zunächst mit diesen optimierten Bedingungen transformiert. Zwar bildeten sich die typischen Zellaggregate und es konnte humanes IgG in den Überständen nachgewiesen werden, allerdings zeigte keine der 671 Kulturen Antikörper, die MSP1₉, AMA1 oder 3D7 Schizontenlysat³⁵ erkannten. Daher war es nötig, die B Zellen semi-immuner Spender mit einer anderen als der für frische PBMCs optimierten Technik zu transformieren. Hierzu wurde eine Methode verwendet, die von FRAUSSEN *et al.* (2010) an der Universität Hasselt (Niederlande) für IgG⁺ / CD22⁺ B Zellpopulationen entwickelt wurde, die mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung angereichert wurden. Die durchflusszytometrische Sortierung der B Zellen der semi-immunen Individuen zur Gewinnung anti-plasmodialer Antikörper erfolgte darüber hinaus nicht nur mit IgG- und CD22-spezifischen Antikörpern, sondern außerdem mit fluoreszenzmarkierten Antigenen, AMA1, MSP1₉, MSP3, Pf38, PIMP und E25T. Dies ermöglichte es, lediglich die antigenspezifischen IgG⁺ / CD22⁺ B Lymphozyten in der

Transformation einzusetzen. Die erste EBV Transformation nach FRAUSSEN *et al.* wurde an der Universität Maastricht (Niederlande) in den Laboren von Prof. Marc De Baets durchgeführt, die zweite erfolgte am Fraunhofer IME in Aachen.

III.1.3. Effizienz der modifizierten EBV Transformation nach FRAUSSEN *et al.* (2010)

Für die erste Transformation nach FRAUSSEN *et al.* (2010) (Abschnitt II.2.2.4.) wurden $1,4 \times 10^7$ vitale PBMCs des ghanaischen Spenders 0013³⁶ eingesetzt, aus denen 4.869 spezifische IgG⁺ / CD22⁺ B Zellen (0,035% von $1,4 \times 10^7$) isoliert und in 90 Nöpfen zu je 50 Zellen je Napf transformiert wurden. Drei Wochen nach der Infektion mit EBV hatten sich in 13 der 90 Nöpfe (14,44%) Zellaggregate gebildet. Sieben Wochen nach der Transformation sezernierten hiervon vier Kulturen (4,44% von 90) spezifische Antikörper gegen AMA1 oder E25T, nicht jedoch gegen MSP1₁₉ oder 3D7 Schizontenlysat. Sechzehn Wochen nach der Transformation sezernierten nur noch zwei Kulturen, 5/E8 und 5/F6, IgG. Diese richteten sich gegen das Multidomänenprotein E25T.

Bei der zweiten EBV Transformation wurden $1,1 \times 10^7$ vitale PBMCs des ghanaischen Spenders 0010⁴³ eingesetzt. Eine Anzahl von 14.048 spezifischen IgG⁺ / CD22⁺ B Zellen (0,138% von $1,1 \times 10^7$) wurden gewonnen und in 149 Nöpfen transformiert. Vier Wochen nach der Transformation zeigten zwölf Kulturen (8,05% von 149) IgG im Überstand, welches im ELISA mit einem oder mehreren der für die Zellsortierung eingesetzten Antigenen, AMA1 (5 Kulturen), MSP1₁₉ (2 Kulturen), MSP3 (7 Kulturen), Pf38 (3 Kulturen), PIMP (3 Kulturen) und/ oder E25T (2 Kulturen), reagierte.

III.2. Untersuchung der Klonalität lymphoblastoider Zellkulturen

Lymphoblastoide Zellreihen, die auf ca. 50 B Zellen zurückgehen, werden in den meisten Fällen zunächst oligo- oder polyklonal sein bevor sich mit zunehmender Kultivierungszeit ein Klon durchsetzt (vgl. RYAN *et al.*, 2006; FRAUSSEN *et al.*, 2010). Darüber hinaus ist die Vereinzelung von Klonen mittels Verdünnung („Limiting Dilution“) bei lymphoblastoiden Zellreihen ohne Versorgerzellen und ohne erhöhten personellen Aufwand nicht möglich.³⁷ Vor dem Hintergrund der Sicherung der variablen Bereiche schwerer und leichter Immunglobulinketten war es wichtig sicherzugehen, dass für jede Kultur ein angemessener Aufwand betrieben wird, um alle darin enthaltenen V_H- und V_K-Regionen zu gewinnen.

Die in Maastricht transformierten Zellkulturen wurden sukzessive expandiert, sofern möglich. Folglich stand genug genomische DNS und cDNS zur Verfügung, um zu verschiedenen Zeitpunkten ein Spektratyping (Abschnitt II.2.3.5.) der V_H-Regionen durchzuführen. Die in Aachen transformierten Zellen wurden hingegen nicht expandiert, sondern sofort nach der Identifikation vielversprechender Kulturen für die cDNS-Synthese verwendet. Aus diesem Grund war die Menge der cDNS sehr begrenzt. Hier konnte die Fragmentanalyse nur mit cDNS und nur zu einem Zeitpunkt, 4,5 bzw. 7 Wochen nach der Infektion, erfolgen.

Die in Maastricht generierten LCLs des Spenders 0013 waren sieben Wochen nach der Infektion mit EBV mono- bis heptaklonal (41% monoklonal, 41% biklonal, 12% tetraklonal,

6% heptaklonal). Die Kultur 5/F6, deren Überstand mit E25T reagierte, war bereits zu diesem Zeitpunkt monoklonal (Abbildung 12). Kultur 5/E8, die zweite Kultur mit Reaktivität gegen E25T hingegen, wies sieben Klone auf. Erst 36 Wochen nach der Transformation war diese Kultur schließlich ebenfalls monoklonal (Abbildung 12).

Bei den in Aachen transformierten B Zellen des Spenders 0010 zeigten sich in 61% der getesteten Kulturen keine Amplikons der Spekratyping PCRs. Die restlichen LCLs schienen monoklonal (28%) oder triklonal (11%) zu sein.

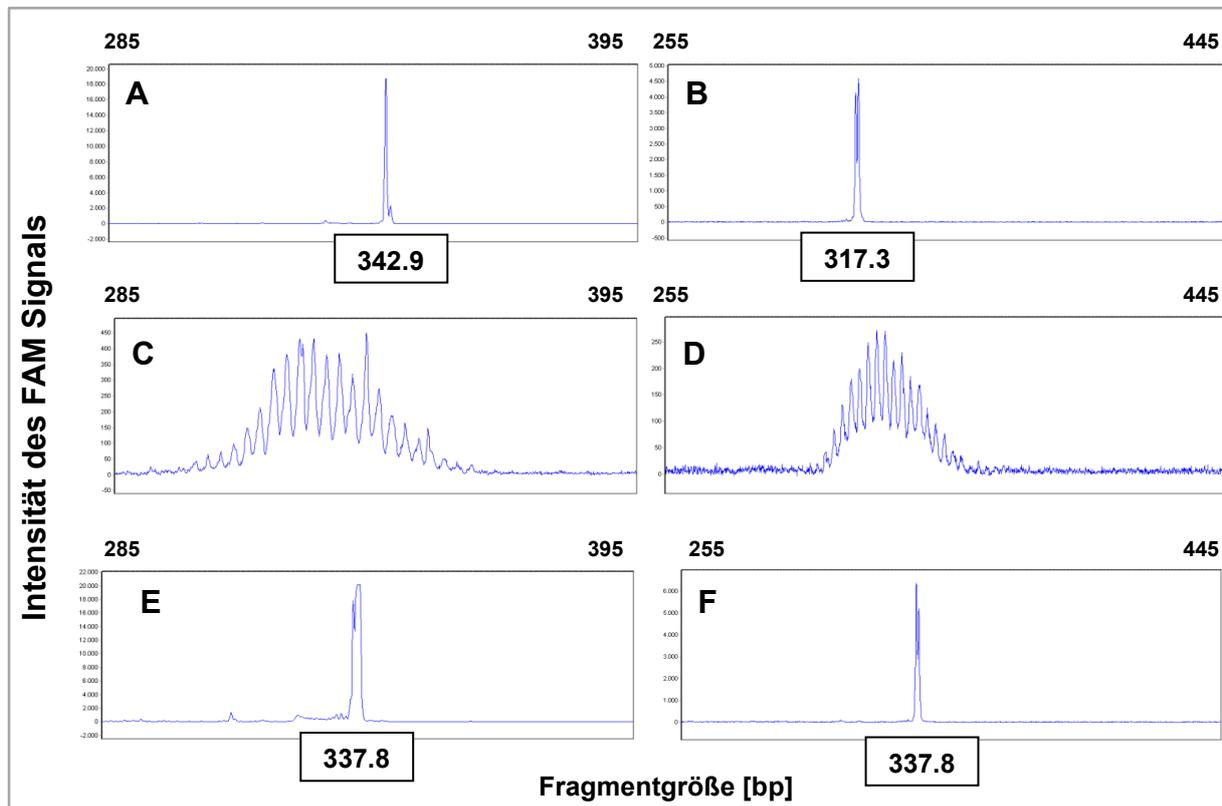


Abbildung 12: Elektropherogramme der Fragmentanalyse der Kulturen 5/F6 und 5/E8. Für dieses Spekratyping (II.2.3.5.) wurde genomische DNS einer 7 Wochen alten Kultur 5/F6 (A) und einer 36 Wochen alten Kultur 5/E8 (B). Als polyklonale Kontrolle wurde genomische DNS aus PBMcs verwendet (C, D). Ramos, eine Burkitt Lymphomzelllinie, diente als Quelle genomischer DNS für den monoklonalen Standard (E, F). Dargestellt sind die Spektren der Reaktion mit den Vorwärtsoligonukleotiden für die Gerüstregion 1, bei der Amplikons von 310-360 bp Größe erwartet werden. Die Detektion der Amplikons erfolgte über das Fluoreszenzsignal des FAM-markierten 3'-Bereichs der Fragmente.

III.3. Sicherung der variablen Bereiche der humanen Antikörper aus lymphoblastoiden Zellreihen³⁸

Die molekularbiologische Sicherung der variablen Bereiche (V_H , V_K , V_L) der schweren und leichten Immunglobulinketten erfolgte mit dem Primersatz von TILLER *et al.* (2008). Wie unter Abschnitt II.2.3.3. beschrieben, wurden bei den LCLs, die in Maastricht generiert worden waren, zunächst für alle PCRs Oligonukleotidmischungen verwendet. Später erfolgte die Sicherung mit dem modifizierten Protokoll, bei dem u.a. bei der ersten PCR erst einzelne

Primerpaare verwendet wurden, um seltenere oder schwerer zu amplifizierende cDNS besser vervielfältigen zu können (vgl. Abschnitt II.2.3.3.).

Bei jenen Zellen, die in Maastricht transformiert worden waren, wurden neun V_H -Sequenzen, fünf V_K -Sequenzen und eine V_λ -Sequenz aus insgesamt fünf Kulturen (1/C3, 4/D2, 5/E8, 5/F6 und 7/D5) amplifiziert und kloniert. Bei der in Aachen durchgeführten Transformation wurden aus 10 Kulturen (1/D9, 1/E4, 2/D6, 4/C4, 6/F10, 8/E5, 11/C10, 12/C4, 12/D7 und 14/E9) 12 V_H -Sequenzen, 16 V_K -Sequenzen und 2 V_λ -Sequenzen isoliert. Die V_H -Sequenzen gehörten zu sieben verschiedenen IgG, einem IgA und vier IgM.³⁹ Die Tabellen 21 bis 24 enthalten detaillierte Informationen zu den gesicherten variablen Bereichen, den jeweils zugrundeliegenden Gensegmenten und – als Maß des Grades der Affinitätsreifung – der Keimbahnhomologie der den V-Gensegmenten entsprechenden Abschnitten.

Um eine Klonierung in die pTRakt Expressionsvektoren zu ermöglichen, mussten zwei V_K - und zwei V_H -Sequenzen mittels zielgerichteter Mutagenese verändert werden (Abschnitt II.2.3.6.). Die eingeführten Mutationen waren stets still und führten nicht zu einem seltenen Kodon. Beide V_H -Sequenzen enthielten in der dritten Gerüstregion eine endogene, d.h. nicht künstlich eingeführte *Sal* I-Schnittstelle. Eine der V_H -Sequenzen gehörte zum generierten AMA1-spezifischen humAb. Die andere V_H -Sequenz gehörte zu jenem humAb, der das zweite EGF-Motiv des MSP10 erkennt (humAb10.3). Bei der V_H -Sequenz des AMA1-spezifischen humAbs war die Schnittstelle nicht durch somatische Hypermutation eingefügt worden. Das zugrundeliegende V-Gensegment (IGHV4-39*07) enthält die *Sal* I-Erkennungssequenz von Natur aus. Bei dem MSP10-EGF2-spezifischen humAb war die Schnittstelle hingegen nicht im Gensegment (IGHV4-4*07 F) kodiert, sondern wurde durch eine Transversionsmutation von Adenin zu Cytosin *in vivo*⁴⁰ eingeführt.

III.4. Testexpression und Identifikation anti-plasmodialer humaner Antikörper⁴¹

Nach der Isolation und Klonierung der variablen Bereiche humaner schwerer und leichter Immunglobulinketten wurden diese in einigen *N. benthamiana*-Blättern testweise als IgG1: κ - oder IgG1: λ 2-Volllängenantikörper exprimiert (Abschnitt II.2.5.). Mit Dotblots und Western Blots wurde die Expression überprüft (Abschnitte II.2.1.5. und II.2.1.6.). Der Gehalt humanen IgGs im Rohextrakt infiltrierter Blätter war mit je ca. 5 mg/mL stets ausreichend. Im Western Blot zeigten sich unter reduzierenden Bedingungen je zwei Banden von ca. 50 kDa und von ca. 25 kDa und unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine oder mehrere Banden von ca. 150 kDa (nicht dargestellt). Antikörperkombinationen, die aus der Transformation der B Zellen des Spenders 0013 stammten, wurden in ELISA auf Spezifität für AMA1, E25T, 3D7 Schizontenlysat und MSP1₁₉ getestet. Jene Antikörperkombinationen, die auf B Lymphozyten des Spenders 0010 zurückgingen, wurden im ELISA mit AMA1, MSP1₁₉, MSP3, Pf38, PIMP und E25T untersucht.

Im Folgenden wird exemplarisch ein ELISA mit Pflanzenrohextrakten aus infiltrierten Blättern dargestellt, der zur Identifikation des Antikörpers humAb10.3 führte, welcher aus Spender 0013 stammt. Hierzu wurde die schwere Kette der Kultur 5/E8 mit je einer von vier κ leichten Ketten exprimiert, die aus den Kulturen 1/C3, 4/D2, 5/E8 oder 5/F6 derselben EBV

Transformation generiert wurden. Abbildung 13(A) stellt die Reaktivitäten der Extrakte gegen E25T und gegen das zweite EGF-Motiv des MSP10 dar. Das Ergebnis des entsprechenden Dotblots ist in Abbildung 13(B) enthalten.

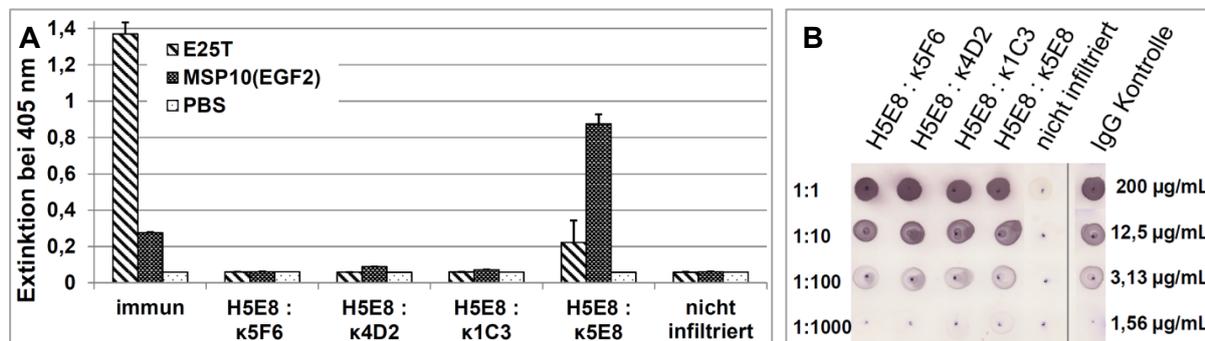


Abbildung 13: ELISA testweise exprimierter humAbs (A) und Dotblot (B) der Rohextrakte. (A) Für diesen ELISA (II.2.1.8.) wurden 100 ng E25T, 100 ng MSP10-EGF2 oder PBS aufgetragen. Als Positivkontrolle diente eine Mischung aus vier ghanaischen Seren (0001, 0005, 0009, 0026) („immun“). Dargestellt sind die Werte bei 1:200 Verdünnung. Als Negativkontrolle wurde Rohextrakt nicht infiltrierter Blätter verwendet („nicht infiltriert“). Die vier Kombinationen aus schwerer Kette 5/E8 und je einer der leichten Ketten κ5/F6, κ4/D2, κ1/C3 oder κ5/E8 wurden in *N. benthamiana* exprimiert wie beschrieben (Abschnitt II.2.5.). Die Rohextrakte der entsprechenden Blätter (II.2.5.2.) wurden 1:100 in PBS verdünnt und im Zweifachansatz aufgetragen. Zum Nachweis diente ein AP-markierter Antikörper (Ziege anti-humanes IgG). Die Extinktion bei 405 nm wurde nach 20 min ausgelesen. Die Fehlerbalken entsprechen Standardabweichungen. (B) Dotblot zum Nachweis humanen IgGs in unverdünnten („1:1“) und 1:10 bis 1:1000 verdünnten Rohextrakten infiltrierter und nicht infiltrierter Blätter (II.2.1.6.). Es wurden je 5 µL Extrakt aufgebracht. Die Detektion erfolgte mit AP-markiertem Antikörper (Ziege anti-humanes IgG) und NBT/BCIP. Die Entwicklungszeit betrug 10 min.

Es wird deutlich, dass E25T und das zweite EGF-Motiv des MSP10 bei 100-facher Verdünnung vom Serum semi-immuner Spender und von einem der rekombinanten humAbs erkannt wird. Derjenige Antikörper, H5/E8:κ5/E8 (humAb10.3), der diese beiden Antigene erkennt, trägt die authentische Kombination von schwerer und leichter Kette der Kultur 5/E8.

Aus den Zellen der in Maastricht durchgeführten EBV Transformation wurden neun schwere und sechs leichte Immunglobulinketten generiert. Von den getesteten Kombinationen reagierten drei mit E25T, davon zwei mit dem ersten EGF-Motiv des MSP10 und eine Kombination mit dem zweiten EGF-Motiv des MSP10. Die MSP10-EGF1-spezifischen Antikörper wurden humAb10.1 und humAb10.2 genannt. HumAb10.3 erkennt MSP10-EGF2.

Bei der Sicherung der variablen Bereiche der Kulturen der in Aachen durchgeführten Transformation wurden sieben V_H -Sequenzen erhalten, die zu IgG gehören. Diese wurden als Volllängenantikörper zusammen mit 16 κ leichten Ketten und 2 λ leichten Ketten testweise exprimiert. Von diesen Kombinationen erkannte eine ein plasmodiales Antigen, AMA1. Der entsprechende Antikörper wurde humAbAMA1 benannt.

Folglich wurden im Rahmen dieser Arbeit vier humAbs generiert, von denen drei das doppelte EGF-Motiv des Merzitenoberflächenproteins 10 (MSP10) erkennen sowie einer, der spezifisch für das Apikale Membranantigen 1 (AMA1) ist. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Kombinationen der Immunglobulinketten der vier anti-plasmodialen humAbs, deren Ursprung und deren Affinitätsreifung.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Kombinationen schwerer und leichter Ketten der MSP10- oder AMA1-spezifischen humAbs. Die MSP10-spezifischen Antikörper humAb10.1, 10.2 und 10.3 stammen aus den in Maastricht transformierten Zellen des ghanaischen Spenders 0013. HumAb10.1 und 10.2 haben die schwere Kette gemein, humAb10.1 und 10.3 die leichte Kette. HumAb10.2 und 10.3 besitzen die authentischen Kombinationen von schwerer und leichter Kette. HumAbAMA1 wurde aus Kultur 1/E4 der in Aachen transformierten B Zellen des ghanaischen Spenders 0010 generiert. Die Analyse der V_H - und V_K -Regionen erfolgte mithilfe des V Quest Werkzeugs (www.imgt.org). *Als Maß der Affinitätsreifung ist die Keimbahnhomologie angegeben, die sich auf den dem V-Gensegment entsprechenden Bereich bezieht.

Antikörper	Spezifität	Ursprungskultur	Gensegmente	Keimbahn-Homologie*
humAb10.1	MSP10 (EGF1)	V_H 5/F6	IGHV3-23*04 F, IGHD3-22*01, IGHJ4*02 F	87%
		V_K 5/E8	IGKV3-20*01 F, IGKJ1*01 F	87%
humAb10.2	MSP10 (EGF1)	V_H 5/F6	IGHV3-23*04 F, IGHD3-22*01, IGHJ4*02 F	87%
		V_K 5/F6	IGKV3-20*01 F, IGKJ1*01 F	91%
humAb10.3	MSP10 (EGF2)	V_H 5/E8	IGHV4-4*07 F, IGHD3-22*01 F IGHJ5*01 F oder IGHJ5*02 F	83%
		V_K 5/E8	IGKV3-20*01 F, IGKJ1*01 F	87%
humAbAMA1	AMA1	V_H 1/E4	IGHV4-39*07 F, IGHD3-16*01 F, IGHJ4*02 F	89%
		V_K 1/E4	IGKV1-5*03, IGKJ3*01 F	96%

III.5. Vergleich der affinitätsgereiften Antikörper mit ihren nicht mutierten Vorläufern

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Identifikation der vier anti-plasmodialen humAbs beschrieben, die MSP10 oder AMA1 erkennen und insgesamt auf drei schwere und drei κ leichte Ketten zurückzuführen sind. Im Folgenden soll beleuchtet werden, an welchen Stellen der variablen Bereiche eine Affinitätsreifung *in vivo* stattgefunden hat. Da die Information der nicht mutierten Vorläufer nicht vorliegt, wurden diese soweit möglich anhand der V Quest Analyse abgeleitet.⁴² Die folgenden Abbildungen stellen die Aminosäuresequenzen der V_H - und V_K -Bereiche der IgG humAb10.2, humAb10.3 und humAbAMA1 und deren Vorläufern dar. Tabelle 14 fasst die Anzahl der DNS- und Aminosäuremutationen in den Gerüstregionen und hypervariablen Regionen der drei Antikörper zusammen. Besonders auffällig ist die hohe Anzahl an Aminosäureaustauschen in den dritten Gerüstregionen der schweren Ketten von humAb10.3 und humAbAMA1.

A			
VH.humAb10.2(5/F6)_affinitätsgereift	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLS	CVVSGFRISTAMSWVRQVPKGL	EWVSDISESGGSKDY 60
VH.humAb10.2(5/F6)_nicht_affinitätsgereift	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLS	CAASGFTFSSYAMSWVRQAPKGL	EWVSAISGSGGSTYY 60
***** *:*:***** * * * * *			
VH.humAb10.2(5/F6)_affinitätsgereift	ADSVRGRFTISRDTSKNTLYLQ	MNSLGADDTALYCAKSVGYFDT	SGYYRWDYFDSWGQG 120
VH.humAb10.2(5/F6)_nicht_affinitätsgereift	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAKXXYYDS	SGYXXYFDYWGQG 120
****:***** *:*:***** * * * * *			
VH.humAb10.2(5/F6)_affinitätsgereift	TLVTVSS	127	
VH.humAb10.2(5/F6)_nicht_affinitätsgereift	TLVTVSS	127	

B			
Vk.humAb10.2(5/F6)_affinitätsgereift	EIVLTQSPDTLSLSPGETATLS	CRASQTVRRNSLAWYQKPGQAP	RLLIYGASDRATGIP 60
Vk.humAb10.2(5/F6)_nicht_affinitätsgereift	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLS	CRASQSVSSYLAWYQKPGQAP	RLLIYGASSRATGIP 60
***** *:*:***** * * * * *			
Vk.humAb10.2(5/F6)_affinitätsgereift	DRFSGSGGFTDFTLTISRLEP	EDFAVYYCQYQYSPRTFGQGT	KVEIK 108
Vk.humAb10.2(5/F6)_nicht_affinitätsgereift	DRFSGSGGTDFTLTISRLEP	EDFAVYYCQYQYSPRTFGQGT	KVEIK 108
***** *:*:***** * * * * *			
C			
VH.humAbAMA1_affinitätsgereift	QVQLQESGPGLVKPKSETLSL	TCSVSVSSTVFYWGWRISPGK	GLEWIGSIYYSGSTY 60
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgereift	QVQLQESGPGLVKPKSETLSL	TCTVSGGISSSSYWGWRIRPP	PKGLEWIGSIYYSGSTY 60
::***** * * * * *			
VH.humAbAMA1_affinitätsgereift	YI (a) ELKSRITLSVETSERQFSL	RLLSSVTAADTAVYYCARGAIN	FGGYSFGTFYFDIWGQ 120
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgereift	YI (b) PSLKRVTISVDTSKNQFSL	KLSSVTAADTAVYYCARXXIN	FGGXXXXXXYFDYWGQ 120
** *:*:***** * * * * *			
VH.humAbAMA1_affinitätsgereift	GTLITVSS	128	
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgereift	GTLVTVSS	128	
:*			
Vk.humAbAMA1_affinitätsgereift	DIQMTQSPSTLSASVGDRTIT	CRASQISITTLAWYQKPKGTAP	KLLIYKASILETGVP 60
Vk.humAbAMA1_nicht_affinitätsgereift	DIQMTQSPSTLSASVGDRTIT	CRASQISSWLAWYQKPKGKAP	KLLIYKASSLESVGP 60
***** *:*:***** * * * * *			
Vk.humAbAMA1_affinitätsgereift	RFSGSGSGTFTLTITISLQPD	FATYYCQYSTHLFPGPGTKVD	105
Vk.humAbAMA1_nicht_affinitätsgereift	RFSGSGSGTEFTLTITISLQPD	FATYYCQYNSYSFTFGPGTKVD	105
***** *:*:***** * * * * *			

Abbildung 14: Vergleiche der Aminosäuresequenzen der V_H- und V_K-Bereiche der Antikörper humAb10.2 (A), humAb10.3 (B) und humAbAMA1 (C) mit ihren jeweiligen nicht affinitätsgereiften Vorläufern. Die Aminosäuresequenzen der nicht mutierten variablen Bereiche wurden basierend auf der V Quest Analyse (www.imgt.org) abgeleitet. Sofern die Nukleotide nicht eindeutig bestimmt werden konnten, wurden entsprechende Abschnitte durch konsekutive ‚N‘ ersetzt. Diese resultieren entsprechend in nicht definierten Aminosäureresten (‚X‘). Die dazugehörigen DNS-Sequenzen sind im Anhang zu finden (Abbildungen 32 bis 34). CDRs sind mit blauen Pfeilen visualisiert. Prolinylseitenketten, die in affinitätsgereiften Sequenzen des humAb10.3 und des humAbAMA1 zu Leucyl-, Serinyl- bzw. Glutamyresten mutiert sind, sind mit roten Ovalen kenntlich gemacht. In Grün sind Tyrosinreste markiert, die in Säugetierzellen sulfatyliert werden können. Pfeile kennzeichnen die drei Argininreste in der dritten Gerüstregion der schweren Kette des humAbAMA1. ‚*‘: identische Aminosäurereste; ‚:‘: Aminosäurereste mit sehr ähnlichen Eigenschaften (Kennwert > 0,5 in der Gonnet PAM 250 Matrix); ‚.‘: Aminosäurereste mit ähnlichen Eigenschaften (Kennwert < 0,5 in der Gonnet PAM 250 Matrix). Die Vergleiche wurden mithilfe von Clustal Omega durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk>).

Tabelle 14: Zusammenfassung der DNS- und Aminosäuremutationen in den Gerüstregionen und CDRs der von humAb10.2, humAb10.3 und humAbAMA1. Diese Übersicht basiert auf Sequenzvergleichen der variablen Bereiche der schweren und leichten Ketten der humAb10.2, humAb10.3 bzw. humAbAMA1 mit ihren jeweiligen nicht mutierten Vorläufern. Im Fall der CDRH3 aller drei Antikörper kann die tatsächliche Anzahl der *in vivo* eingeführten Mutationen nicht exakt bestimmt werden, da hier N-Nukleotide vorliegen. Siehe hierzu auch Abbildungen 14, 32, 33 und 34.

Antikörper	Bereich	Aminosäureaustausche (DNS-Mutationen)							
		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	total
humAb 10.2	V _H	4 (8)	4 (8)	2 (3)	2 (5)	6 (14)	≥2 (≥5)	0 (0)	≥24 (≥43)
	V _K	2 (4)	5 (6)	0 (2)	0 (0)	4 (8)	1 (5)	0 (1)	12 (26)
humAb 10.3	V _H	2 (6)	4 (8)	2 (3)	4 (8)	12 (23)	≥5 (≥8)	1 (3)	30 (≥59)
	V _K	2 (5)	5 (9)	1 (6)	1 (2)	4 (9)	2 (7)	1 (2)	16 (40)
humAb AMA1	V _H	2 (2)	5 (8)	1 (2)	0 (2)	8 (17)	≥1 (7)	1 (1)	≥18 (≥39)
	V _K	0 (0)	2 (2)	1 (2)	0 (0)	3 (4)	4 (7)	0 (0)	10 (15)

III.6. Expression und Reinigung humaner Antikörper

Die Produktion größerer Mengen der rekombinanten humAbs (100-200 mg) erfolgte in transient transfizierten *N. benthamiana*-Pflanzen (Abschnitt II.2.5.). Im Folgenden sind die Ergebnisse der Reinigung der humAbs aus partikelfreien Rohextrakten mittels Protein-A-Chromatographie exemplarisch dargestellt.

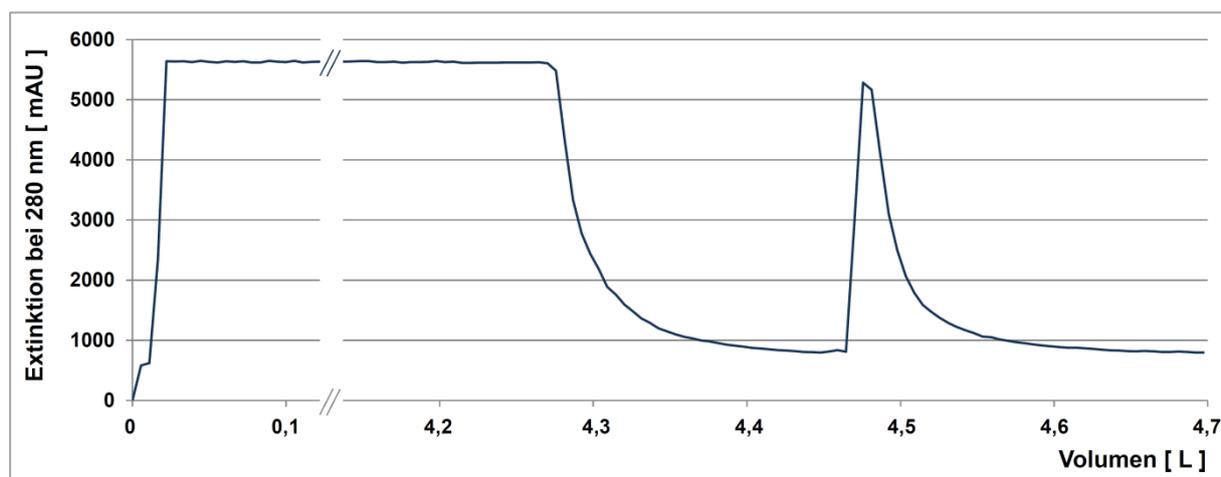


Abbildung 15: Chromatogramm einer repräsentativen Reinigung humaner Antikörper über Protein-A. Für diese Affinitätschromatographie (II.2.5.3.) wurden 3,3 L partikelfreier *N. benthamiana*-Rohextrakt (II.2.5.2.) mit einer Flussrate von 3,7 mL/min auf eine „Protein A, Hyper D“ Keramiksäule von 20 mL geladen. Die Elution des Antikörpers, in diesem Fall humAbAMA1, erfolgte mit 0,2 M Natriumzitat (pH 2,5); das Eluat wurde sofort mit 1 M Tris HCl (pH 9,0) neutralisiert. Der Proteingehalt während der Chromatographie wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm erfasst.

Die Proteinzusammensetzung der Fraktionen der aufgeschlossenen Blätter und der Chromatographie wurde mithilfe von SDS-PAA Gelen und Western Blots untersucht (Abschnitte II.2.1.4. und II.2.1.5.). Abbildung 16 zeigt ein repräsentatives Ergebnis solcher Analysen. Unter reduzierenden Bedingungen zeigten sich im Coomassie-gefärbten Gel und im Western Blot Banden von 50 kDa und 25 kDa, wobei das Signal bei 50 kDa einen Doublettencharakter aufwies. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigten sich im Eluat

sowohl im Coomassie-gefärbten Gel als auch im Western Blot Banden von mehr als 80 kDa apparenter Masse. Eine analytische Gelfiltration (Abschnitt II.2.5.4.) diente der weitergehenden Untersuchung des Anteils von Antikörpermultimeren, H₂- (100 kDa), H₂:L- (125 kDa) oder H₂:L₂- (150 kDa) Komplexen in den Elutionsfraktionen (Abbildung 17).

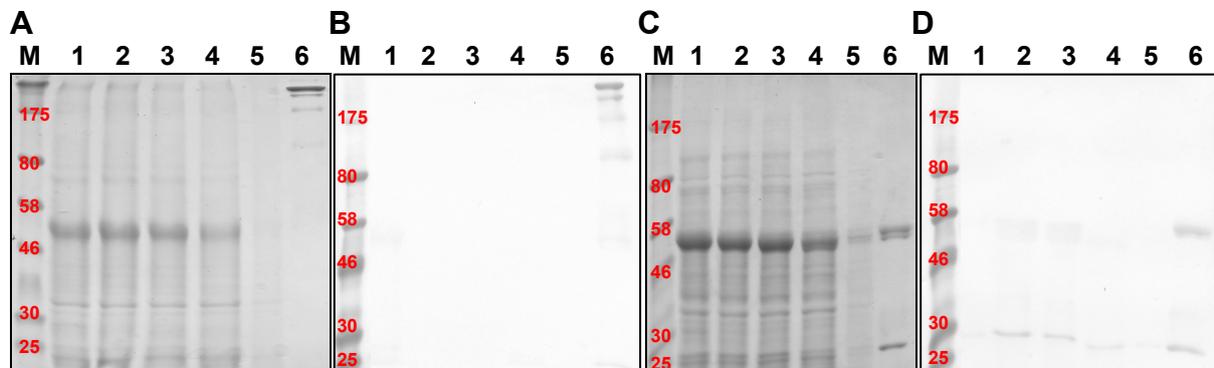


Abbildung 16: Coomassie-gefärbte SDS-PAA Gele (A, C) und Western Blots (B, D) nicht reduzierter (A, B) und reduzierter (C, D) Fraktionen aufgearbeiteter *N. benthamiana*-Pflanzen und der Protein-A-Chromatographie. Die Proteine der Fraktionen des aufbereiteten des Pflanzenextrakts (1-3) (II.2.5.2.) und der Protein-A-Chromatographie (4-6) (II.2.5.3.) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (II.2.1.4.) und für einen anschließenden Western Blot auf Nitrozellulose übertragen (II.2.1.5.). Die Detektion schwerer und leichter Ketten humaner IgG erfolgte mit AP-markiertem Antikörper (1:5000 Ziege anti-humanes IgG(H+L)). Die Nitrozellulosemembranen wurden 5 min in NBT/BCIP entwickelt. M: Größenstandard; 1: Filtrat nach Filtration durch Gase; 2: Überstand nach Zentrifugation; 3: partikelfreies Filtrat (0,45 µm), das auf die Protein-A-Chromatographiesäule geladen wurde; 4: Durchflussfraktion; 5: Waschfraktion; 6: Eluat. Das Eluat wurde so verdünnt, dass in jeder Tasche 6 ca. 2 µg IgG geladen wurden. Die Größen der Referenzbanden in kDa sind in roter Schrift angegeben.

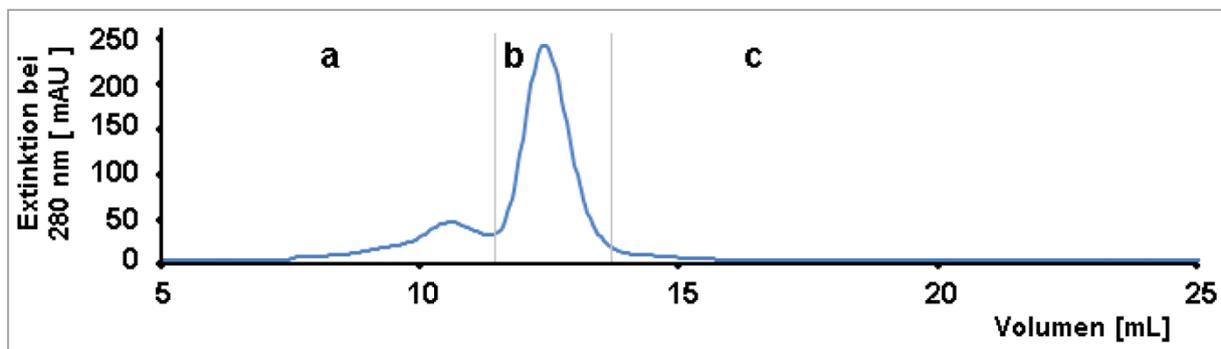


Abbildung 17: Analytische Gelfiltration zur Bestimmung der Zusammensetzung der aus *N. benthamiana* gereinigten Antikörper. Rekombinant exprimierter, mittels Protein-A-Chromatographie (II.2.5.3.) gereinigter humAb10.2 wurde mithilfe einer „Superdex 200“ Gelfiltrationssäule von 22,23 mL mit einer Flussrate von 0,5 mL/min mit PBS aufgetrennt (II.2.5.4.). Das Eluat wurde in 1 mL-Fractionen aufgefangen und der Proteingehalt durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt.

Es stellte sich heraus, dass bei den aus *N. benthamiana* gereinigten humAbs ca. 81% des totalen Proteins 150 kDa große Proteine (Abbildung 17b) waren. Multimere Proteine/ Proteinaggregate von über 150 kDa Größe (a) stellten 17% dar; 2% der Proteine waren kleiner als 150 kDa (c).

Die Ausbeute humaner Antikörper aus Pflanzen betrug durchschnittlich 60 mg je kg Blattmaterial. Die Mittelwerte für humAb10.1, 10.2 und 10.3 waren 74,1 mg/kg, 58,4 mg/kg bzw. 35,3 mg/kg. Die Ausbeute des humAbAMA1 betrug 70,7 mg/kg.

HumAb10.2 und humab10.3 wurden außerdem aus den Zellkulturüberständen der LCLs 5/E8 (humAb10.3) und 5/F6 (humAb10.2)⁴³ über Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Verläufe der Chromatogramme entsprachen jenen der Reinigungen humanen IgGs aus Pflanzenrohextrakten. Die Integrität der Antikörper und die Proteinzusammensetzung der Chromatografiefraktionen wurde wiederum mittels SDS-PAGE und Western Blots untersucht (Abbildung 18). Hier zeigt sich in den Eluaten dasselbe Bandenmuster wie bei den rekombinant produzierten humAbs. Aufgrund geringer Ausbeuten entfiel bei den aus LCL Überständen gewonnenen Antikörpern die analytische Gelfiltration.

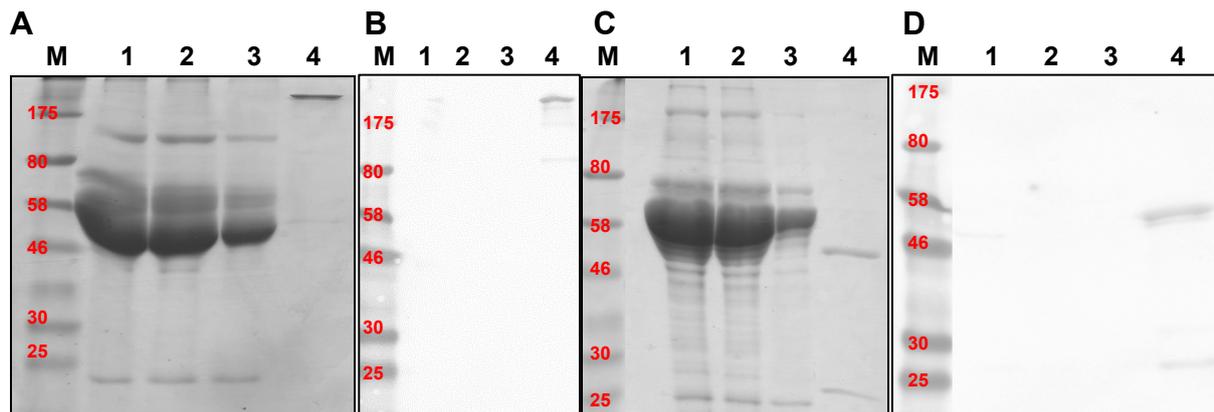


Abbildung 18: Coomassie-gefärbte SDS-PAA Gele (A, C) und Western Blots (B, D) nicht reduzierter (A, B) und reduzierter (C, D) Fraktionen der Protein-A-Chromatographie lymphoblastoider Zellkulturüberstände. Die Proteine der Affinitätschromatografiefraktionen (II.2.5.3.) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (II.2.1.4.) und für einen anschließenden Western Blot auf Nitrozellulose transferriert (II.2.1.5.). Die Detektion schwerer und leichter Ketten humanen IgGs erfolgte mit AP-markiertem Antikörper (1:5000 Ziege anti-humanes IgG(H+L)). Die Nitrozellulosemembranen wurden 5 min in NBT/BCIP entwickelt. M: Größenstandard; 1: Patrikelfreier Zellkulturüberstand; 2: Durchflussfraktion; 3: Waschfraktion; 4: Eluat. Das Eluat wurde so verdünnt, dass in jeder Tasche 4 ca. 1,25 µg IgG geladen wurden. Der Größenstandard in kDa ist in roter Schrift angegeben.

Die Ausbeute humaner Antikörper aus Überständen der lymphoblastoiden Zellen betrug im Mittel 12,2 mg/L. Der Mittelwert für LCL 5/E8 entsprach 10,3 mg/L, jener für LCL 5/F6 15,1 mg/L.

III.7. ELISA und Dotblots

III.7.1. ELISA und Dotblots zur Spezifitätsbestimmung der humanen monoklonalen Antikörper

Um sicherzustellen, dass die rekombinanten, gereinigten humAbs funktional sind und um ihre Spezifität zu untersuchen, wurden Dotblots und ELISA durchgeführt. Abbildung 19 stellt die Ergebnisse für humAb10.1, 10.2 und 10.3 dar. Es zeigte sich, dass humAb10.1 und humAb10.2 spezifisch für das erste EGF-Motiv des MSP10 sind, humAb10.3 hingegen für das zweite EGF-Motiv des MSP10. HumAb10.1 erkannte MSP10-EGF1 im Dotplot nur sehr schwach (Abbildung 19(A)). In einem ELISA mit denselben, für den Dotplot verwendeten, nicht-reduzierten EGF-Motiven von MSP1, MSP8, MSP4 und MSP10 zeigte sich eine stärkere Reaktivität mit MSP10-EGF1, jedoch mit keinem der anderen EGF-Motive (nicht

dargestellt). Die entsprechenden Überstände der lymphoblastoiden Kulturen zeigten dieselben Spezifitäten (Abbildung 19(B)). Wurden die Antigene reduziert, wurden MSP10-EGF1 und MSP10-EGF2 nicht mehr erkannt.

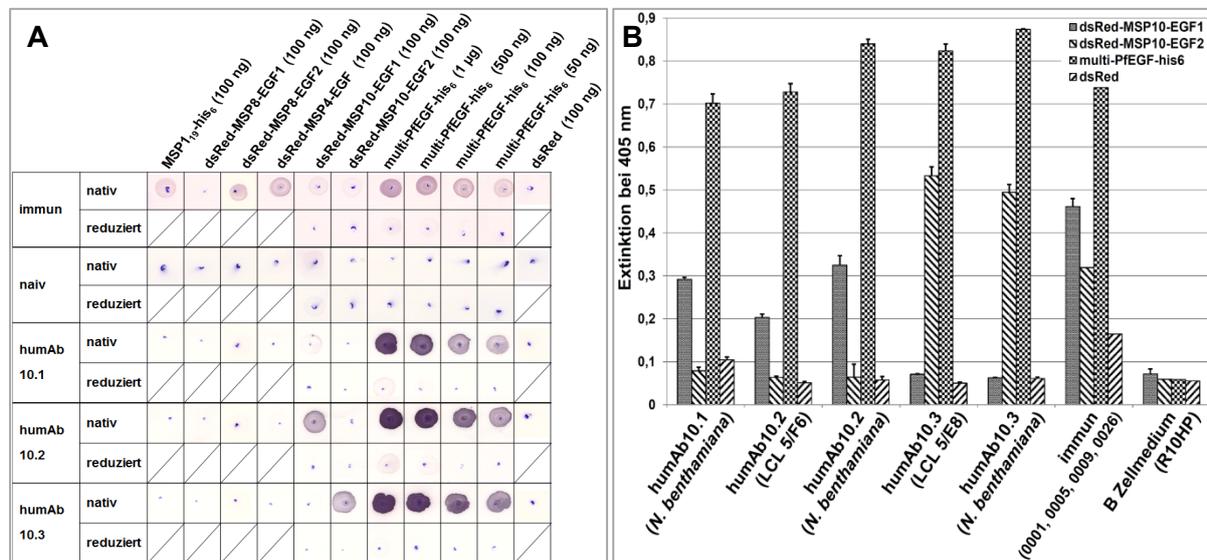


Abbildung 19: Dotplot (A) und ELISA (B) zur Spezifitätsbestimmung der MSP10-spezifischen humAbs.

(A) Für den Dotplot (II.2.1.6.) wurden 100 ng verschiedener *P. falciparum* EGF-Motive (MSP1₁₉-his₆, dsRed-MSP8-EGF1, dsRed-MSP8-EGF2, dsRed-MSP4-EGF, dsRed-MSP10-EGF1, dsRed-MSP10-EGF2), 100 ng dsRed oder 50 ng bis 1 µg multi-PfEGF-his₆ auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht. Multi-PfEGF-his₆ wurde außerdem reduziert und alkyliert und in denselben Mengen aufgetragen wie die native Variante. Gereinigte humAb10.1, 10.2 und 10.3 wurden rekombinant in Tabak produziert und in Konzentrationen von 100 µg/mL, 50 µg/mL bzw. 1,4 µg/mL eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde ein Serummix von vier ghanaischen Spendern (0001, 0005, 0009, 0026) in 1:100 Verdünnung („immun“) verwendet. Eine Mischung zweier europäischer Spender wurde in derselben Verdünnung eingesetzt („naiv“). Die Detektion erfolgte mit AP-markiertem Antikörper (1:5000 Ziege anti-humanes IgG(H+L)) und NBT/ BCIP. (B) Für diesen ELISA (II.2.1.8.) wurden 60 ng jedes Antigens (dsRed-MSP10-EGF1, dsRed-MSP10-EGF2, multi-PfEGF-his₆ oder dsRed) in Näpfe einer hochbindenden Mikrotiterplatte aufgebracht. Die in *N. benthamiana* produzierten, gereinigten MSP10-spezifischen Antikörper wurden in Konzentrationen von 150 µg/mL (humAb10.1), 1,5 µg/mL (humAb10.2) oder 3 µg/mL (humAb10.3) eingesetzt. Überstände der lymphoblastoiden Zellen 5/F6 (humAb10.2) und 5/E8 (humAb10.3) wurden unverdünnt verwendet. Als Kontrolle wurde B Zellmedium eingesetzt. Als Positivkontrolle („immun“) diente eine Mischung aus vier ghanaischen Seren (0001, 0005, 0009, 0026) in 1:200 Verdünnung. Der Nachweis gebundenen IgGs erfolgte mit AP-markiertem Antikörper (1:5000 Ziege anti-humanes IgG(H+L)). Der ELISA wurde nach 15 min Entwicklungszeit ausgelesen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (Fehlerbalken) von Dreifachmessungen.

Zur Untersuchung der Interaktion des humAbAMA1 mit seinem Antigen wurde ein ELISA mit nativem und reduziertem/ alkyliertem AMA1 3D7 durchgeführt. In Abbildung 20 wird deutlich, dass humAbAMA1 spezifisch für ein konformationelles Epitop ist. Im Serum des Spenders 0010, aus welchem humAbAMA1 stammt, ließen sich ebenfalls IgG nachweisen, die bevorzugt konformationelle Epitope des AMA1 erkennen.

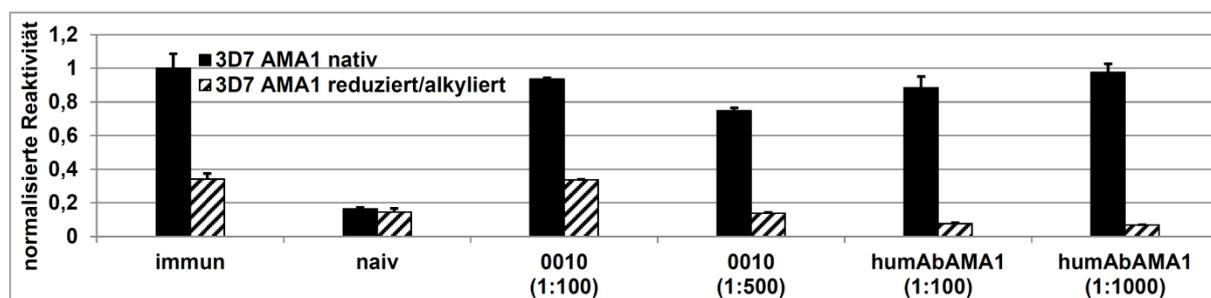


Abbildung 20: ELISA zur Bestimmung der konformationellen Abhängigkeit der AMA1:humAbAMA1-Interaktion. Für diesen ELISA (II.2.1.8.) wurden je Napf 50 ng natives AMA1 3D7 oder reduziertes/alkyliertes AMA1 3D7 derselben Charge in hochbindende Mikrotiterplatten aufgebracht. Als Kontrollen dienten ein 1:100 verdünnter ghanaischer Serummix (0001, 0005, 0009, 0026) („immun“) und eine Serumischung nicht exponierter Spender („naiv“). Das Serum des Spenders 0010, aus welchem humAbAMA1 stammt, wurde 1:100 und 1:500 verdünnt. HumAbAMA1 aus frischem Pflanzenrohextrakt wurde 100- und 1000-fach verdünnt eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem IgG-spezifischen Antikörper (1:5000 Ziege anti-humanes IgG(γ)). Die Extinktion bei 405 nm wurde nach 20 min ausgelesen. Die Extinktionswerte zweier Platten wurden mithilfe der 1:100 verdünnten Positivkontrolle normalisiert. Die Ursprungswerte dieser Kontrolle lagen bei 0,864 bzw. 1,096. Es handelt sich um Zweifachmessungen. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

III.7.2. Reaktivität ghanaischer Seren mit MSP10 und AMA1

Da im Rahmen dieser Arbeit humane monoklonale Antikörper isoliert wurden, die sich gegen die *P. falciparum*-Proteine MSP10 und AMA1 richten, interessierte gerade bei diesen Antigenen der Grad der Erkennung durch Antikörper (IgG) der Seren ghanaischer Spender.⁴⁴ Abbildung 21 gibt die Reaktivität gegen das erste und das zweite EGF-Motiv des MSP10 wieder, welche als dsRed-Fusionsproteine produziert wurden.

In einem ELISA mit dsRed wurde außerdem überprüft, dass die Seren nicht mit dsRed kreuzreagierten.⁴⁵ Es wird deutlich, dass das erste EGF des MSP10 durch IgG im Serum von elf Spendern erkannt wurde, das zweite EGF von acht. Fünf der 31 Seren erkannten beide Motive (Spender 0006, 0007, 0009, 0013 und 0022). Um die konformationelle Abhängigkeit der Erkennung der EGF-Motive durch die ghanaischen IgG zu adressieren, wurde E25T reduziert und alkyliert und erneut in einem ELISA mit 13 ghanaischen Seren (0002, 0004, 0005, 0006, 0007, 0009, 0013, 0016, 0018, 0020, 0022, 0023, 0026) getestet. Im Durchschnitt war die Reaktivität mit der reduzierten Variante um den Faktor 7,014 (\pm 2,333) geringer. Diese Diskrepanz war signifikant.⁴⁶

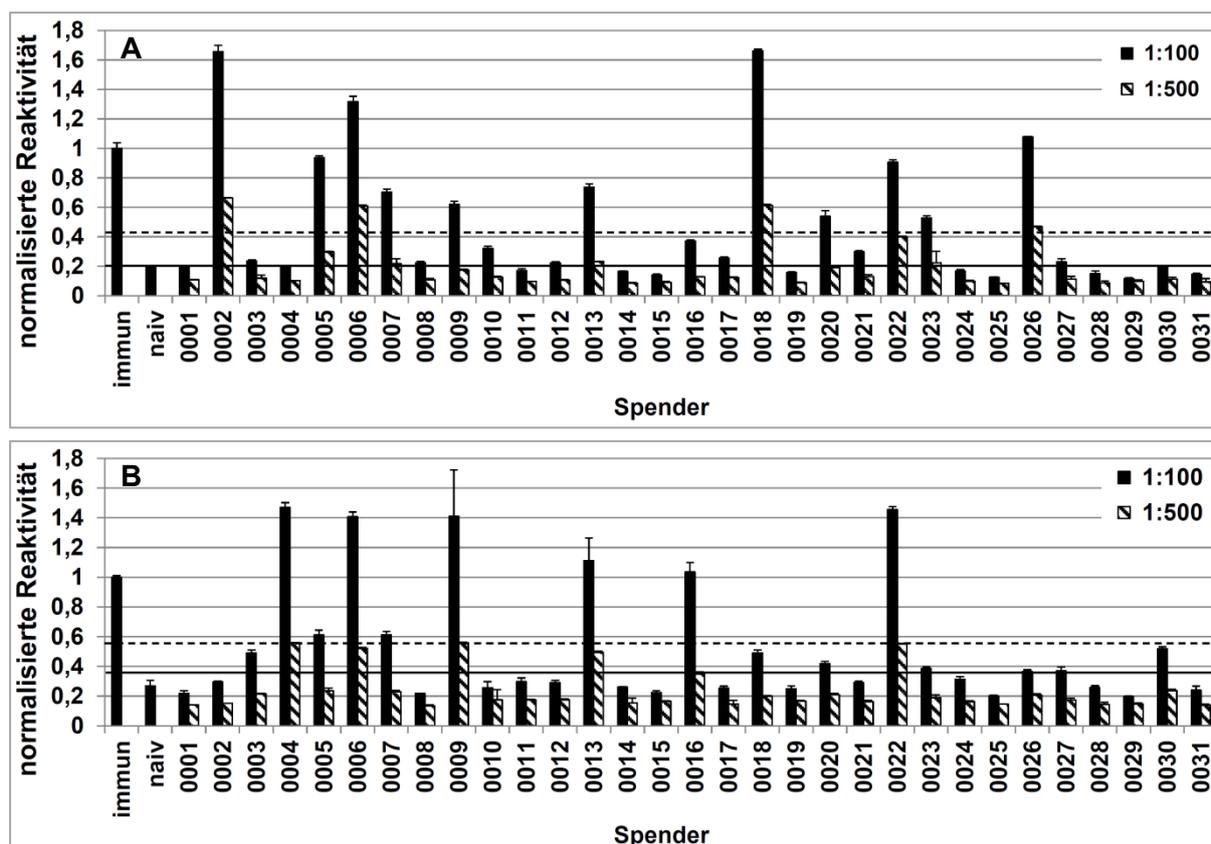


Abbildung 21: Reaktivität der ghanaischen Seren der Spender 0001-00031 gegen die EGF-Motive des PfMSP10. Für diesen ELISA (II.2.1.8.) wurden 50 ng dsRed-MSP10-EGF1 (A) oder dsRed-MSP10-EGF2 (B) je Napf einer hochbindenden Mikrotiterplatte aufgetragen. Als Positivkontrolle diente ein Mix („immun“) aus vier ghanaischen Seren (0001, 0005, 0009, 00026). Als Negativkontrolle wurde eine Mischung aus zwei Seren europäischer Spender genutzt („naiv“). Die Seren der 31 Spender wurden in Verdünnungen von 1:100 und 1:500 in PBS aufgetragen. Als Nachweisantikörper wurde ein AP-markierter Antikörper (Ziege anti-humanes IgG (Fc γ)) in 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Alle Messungen wurden im Dreifachansatz gemessen. Die Extinktionswerte bei 405 nm wurden nach 30 min ausgelesen. Da die Tests mit mehreren Platten durchgeführt werden mussten, wurden alle Werte gegen die der entsprechenden Positivkontrolle normalisiert. Die Originalwerte der Extinktionen lagen bei dieser Kontrolle um 0,9 bei dsRed-MSP10-EGF1 um 0,6 bei dsRed-MSP10-EGF2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Dreifachmessungen dar. Die gestrichelte Linie markiert den doppelten Wert der Extinktion der Negativkontrolle im jeweiligen Experiment. Die durchgezogene schwarze Linie visualisiert die Mittelwerte der Negativkontrollen erhöht um den doppelten Wert der entsprechenden Standardabweichung.

Abbildung 22 zeigt die Erkennung des AMA1 3D7 durch IgG aller 31 ghanaischen Seren. Ein Anteil von 83,8% (26 von 31 Spendern) erkannten dieses Protein. Es wurde außerdem ein ELISA durchgeführt mit reduziertem/ alkyliertem AMA1 3D7 der gleichen Charge, welches in derselben Menge aufgetragen wurde. Diese reduzierte Variante wurde durchschnittlich um den Faktor 3,134 (\pm 1,952) schlechter erkannt. Dieser Unterschied war ebenfalls signifikant.⁴⁷

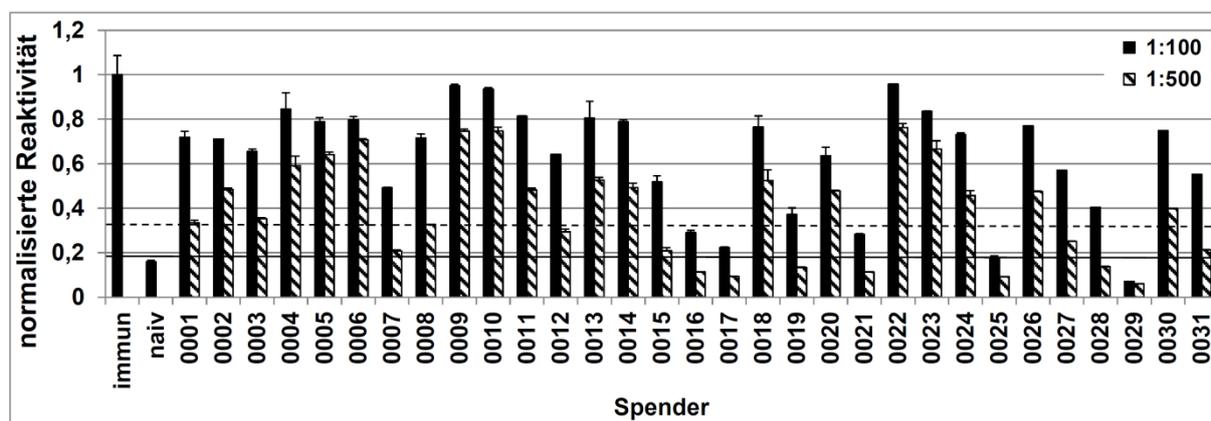


Abbildung 22: Reaktivität der ghanaischen Seren der Spender 0001-00031 gegen AMA1 3D7. Für diesen ELISA (II.2.1.8.) wurden 50 ng AMA1 3D7 je Napf einer hochbindenden Mikrotiterplatte verwendet. Die Positivkontrolle („immun“) setzte sich zusammen aus vier ghanaischen Seren (0001, 0005, 0009, 00026); als Negativkontrolle wurde eine Mischung aus zwei Seren europäischer Spender genutzt („naiv“). Die Seren der 31 Spender wurden 1:100 und 1:500 in PBS verdünnt und im Dreifachansatz aufgetragen. Zum Nachweis diente ein AP-markierter Antikörper (Ziege anti-humanes IgG (Fc γ)) in 1:5000 Verdünnung. Die Extinktionswerte bei 405 nm wurden nach 20 min ausgelesen. Die Werte aller Platten wurden gegen die der entsprechenden Positivkontrolle normalisiert. Die Originalwerte der Extinktionen lagen bei dieser Kontrolle um 1,0. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Dreifachbestimmungen dar. Die gestrichelte Linie dient als Markierung des doppelten Werts der Extinktion der Negativkontrolle. Die durchgezogene schwarze Linie visualisiert den Mittelwert der Negativkontrolle erhöht um den doppelten Wert der entsprechenden Standardabweichung.

III.8. Immunfluoreszenzmikroskopie

Um sicherzustellen, dass die generierten humAbs nicht nur die rekombinanten Antigene erkennen, sondern auch ihre natürlich exprimierten Pendanten, AMA1 und MSP10, wurden Immunfluoreszenzaufnahmen mit Schizonten und Merozoiten angefertigt (Abschnitt II.2.1.10.). Hierzu wurden mit Methanol fixierte Parasiten mit einer Kombination aus je einem der vier humAbs, murinem anti-MSP4-EGF Antikörper und Hoechst gefärbt. Abbildung 23 gibt die Ergebnisse exemplarisch wieder.

Kontrollexperimente ohne Primärantikörper oder mit in Pflanzen exprimiertem humAb 2G12 als Isotypkontrolle zeigten nach Inkubation mit den Nachweisantikörpern (Ziege anti-humanes IgG(H+L) Cy3 und Ziege anti-murines IgG(H+L) Alexa488) eine vernachlässigbare Hintergrundfluoreszenz.

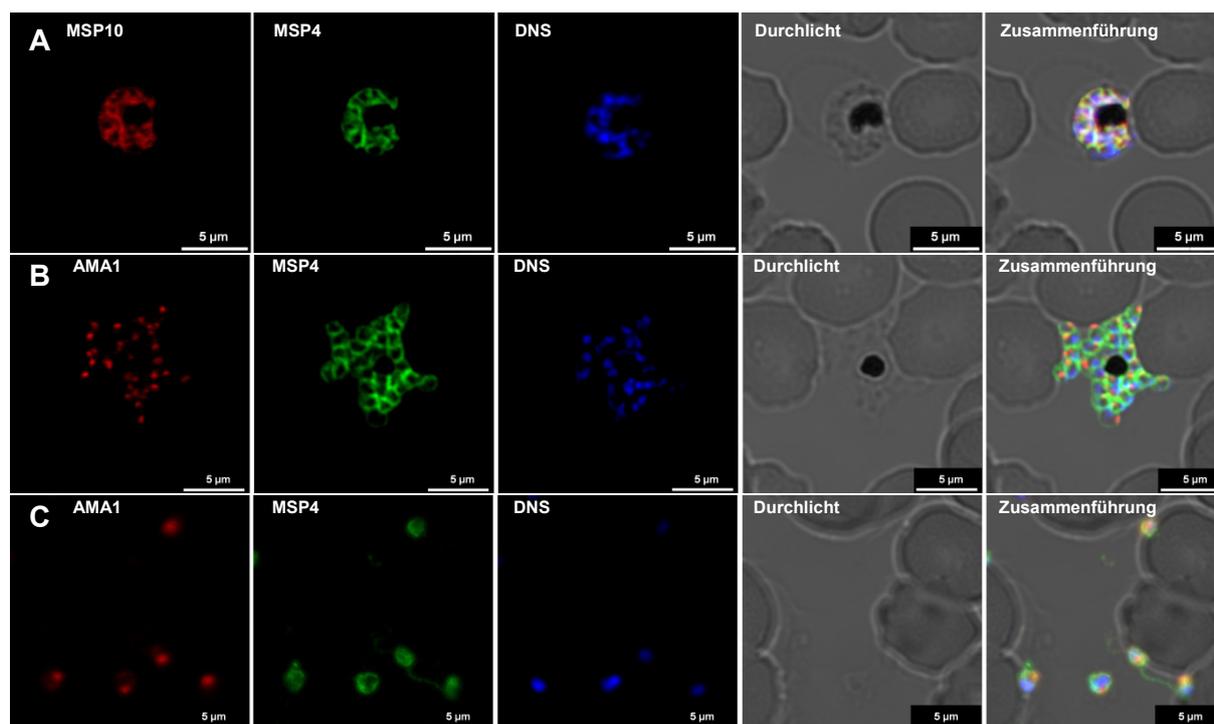


Abbildung 23: Indirekte konfokale Fluoreszenzmikroskopie von *P. falciparum* 3D7 Schizonten und Merozoiten. Für diese Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit Methanol fixierte Schizonten (A, B) und Merozoiten (C) verwendet (II.2.1.10.). Die Färbung von MSP4 erfolgte mit murinem anti-MSP4-EGF Antikörper 2.44 (20 µg/mL) (grün) und jene von DNS mit Hoechst (blau). Die Färbungen von (A) MSP10 wurden mit rekombinatem humAb10.13 (10 µg/mL) (rot) bzw. von (B) AMA1 mit rekombinatem humAbAMA1 (5 µg/mL) (B, C) (rot) durchgeführt. Murine und humane Antikörper wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (1:1000 Ziege anti-humanes IgG(H+L) Cy3 und 1:100 Ziege anti-murines IgG(H+L) Alexa488) detektiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP8 X Konfokalmikroskop bei 630-facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstäbsbalken entsprechen 5 µm Länge.

III.9. Oberflächenplasmonresonanzmessungen⁴⁸

III.9.1. Affinitäten natürlich und rekombinant exprimierter humaner Antikörper

In Abschnitt III.7.1. wurde dargestellt, dass humAb10.1, 10.2 und 10.3 die EGF-Motive des MSP10 erkennen und humAbAMA1 spezifisch für AMA1 ist. Es interessierte außerdem, welchen Bindungskinetiken die Interaktionen gehorchen. Hierzu wurden Oberflächenplasmonresonanzmessungen durchgeführt (Abschnitt II.2.1.9.). Im Falle der MSP10-spezifischen humAbs wurde multi-PfEGF-his₆ verwendet; für humAbAMA1 wurden verschiedene rekombinant exprimierte AMA1-Varianten (DiCo 1, 2, 3, 3D7, FCR-3 und HB3)⁴⁹ genutzt. Tabelle 15 sind die Kennwerte der Kinetiken der MSP10-spezifischen humAbs, welche natürlich und rekombinant exprimiert wurden, zu entnehmen.

Die schwächste Affinität zeigte humAb10.1 mit einem K_D -Wert von $9,27 \times 10^{-7}$ M. Im Vergleich zu humAb10.2, der dieselbe schwere Kette trägt, jedoch die authentische Paarung von schwerer und leichter Kette besitzt, war diese Bindungsstärke des humAb10.1 um den

Faktor 170 geringer als die des rekombinanten humAb10.2 ($K_D = 5,46 \times 10^{-9}$ M). Die Affinitäten von natürlich und rekombinant exprimiertem humAb10.2 unterschieden sich nur marginal um den Faktor 1,2. Dieser Unterschied schien nicht signifikant. Die Affinitäten des in LCLs und in Tabak produzierten humAb10.3 jedoch unterschieden sich etwa um den Faktor 7. Während der von den transformierten B Zellen sezernierte einen K_D -Wert von $8,01 \times 10^{-10}$ M ($\pm 1,60 \times 10^{-10}$ M) aufwies, zeigte der in *N. benthamiana* produzierte humAb10.3 einen entsprechenden Wert von $5,39 \times 10^{-9}$ M ($\pm 1,48 \times 10^{-9}$ M). Dieser Unterschied erwies sich in einem zweiseitigen t-Test als signifikant ($p < 0,05$).

Tabelle 15: Assoziations-, Dissoziations- und Affinitätskonstanten der MSP10-spezifischen humAbs. Für diese kinetischen Oberflächenplasmonresonanzmessungen (II.2.1.9.) wurden die Antikörper mithilfe eines Protein-A-Chips gefangen (100-180 RU). Zur Bestimmung der Assoziationskonstanten wurde multi-PfEGF-his₆ in Konzentrationen von 0,1 bis 540 nM mit einer Flussrate von 30 μ L/min für 180 sec injiziert. Anschließend wurde zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten für 600 sec HBS-EP Puffer injiziert. Für diese Messungen wurde ein Biacore T200 Gerät verwendet. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms „BIAEval 4.0“.

	Expressionssystem		k_a [$M^{-1} \text{sec}^{-1}$]	k_d [sec^{-1}]	K_D [M]
humAb10.1	<i>N. benthamiana</i>		$4,43 \times 10^3$	$4,11 \times 10^{-3}$	$9,27 \times 10^{-7}$
humAb10.2	<i>N. benthamiana</i>		$5,31 \times 10^5$	$2,90 \times 10^{-3}$	$5,46 \times 10^{-9}$
	LCL 5/F6		$4,46 \times 10^5$	$2,95 \times 10^{-3}$	$6,62 \times 10^{-9}$
humAb10.3	<i>N. benthamiana</i>	Messung 1	$3,23 \times 10^5$	$1,40 \times 10^{-3}$	$4,34 \times 10^{-9}$
		Messung 2	$1,41 \times 10^5$	$9,05 \times 10^{-4}$	$6,44 \times 10^{-9}$
	LCL 5/E8	Messung 1	$5,28 \times 10^5$	$3,63 \times 10^{-4}$	$6,88 \times 10^{-10}$
		Messung 2	$2,70 \times 10^5$	$2,48 \times 10^{-4}$	$9,19 \times 10^{-10}$

HumAbAMA1 erkannte alle sechs getesteten AMA1-Varianten – sowohl die natürlichen als auch die synthetischen Konstrukte, AMA1 DiCo1, 2 und 3, welche die Polymorphismen des AMA1 abdecken sollen (REMARQUE *et al.*, 2008a). AMA1 3D7 wurde am stärksten gebunden ($1,88 \times 10^{-10}$ M; $k_a = 6,98 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{sec}^{-1}$; $k_d = 1,31 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$); die Affinitätskonstanten (K_D) für AMA1 HB3, DiCo 1 und DiCo 2 waren mit $1,21 - 4,78 \times 10^{-8}$ M um Faktoren von 174, 254 bzw. 64 geringer. Für AMA1 FCR-3 und DiCo 3 konnten keine K_D -Werte bestimmt werden. Abbildung 24 gibt alle Kinetiken wieder.

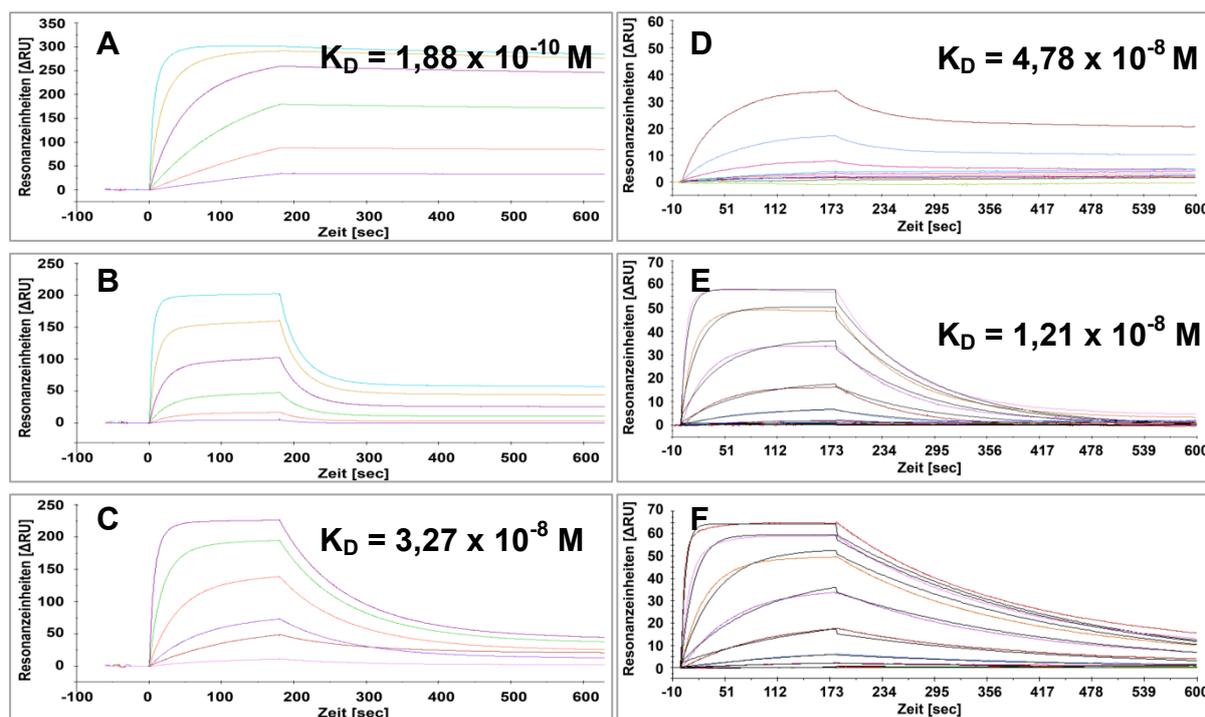


Abbildung 24: Oberflächenplasmonresonanzmessungen mit humAbAMA1 und AMA1 3D7, FCR-3, HB3 und DiCo 1, 2 und 3. Für diese SPR Analyse (II.2.1.9.) wurde rekombinanter, gereinigter humAbAMA1 auf einem Protein-A-Chip gefangen (85-95 RU). AMA1 3D7 (A), AMA1 FCR-3 (B) und AMA1 HB3 (C) wurden in Konzentrationen von 50 bis 3200 nM für 180 sec injiziert. AMA1 DiCo 1 (D), DiCo 2 (E) und DiCo 3 (F) wurden in Konzentrationen von 0,03 bis 600 nM für 180 sec injiziert. Die Oberflächen wurde anschließend für 420 sec mit HBS-EP zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten gewaschen. Es wurde ein Biacore T200 Gerät verwendet. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms „BIAEval 4.0“. Für die FCR-3-Variante und AMA1 DiCo 3 (B, F) konnten keine k_a - und k_d -Werte bestimmt werden.

III.9.2. Kompetitionsmessungen

Es interessierte außerdem, ob humAbAMA1 ein Epitop mit den bekannten AMA1-spezifischen inhibitorischen Antikörpern 1F9 oder 4G2 teilt. Hierzu wurden Oberflächenplasmonresonanzmessungen mit einem regenerierbaren Chip durchgeführt, welcher mit mAb1D7 funktionalisiert ist (Abschnitt II.2.1.9.). Dieser monoklonale Antikörper erkennt ein Epitop des AMA1, welches weit von dessen hydrophober Bindungsfurche entfernt liegt. Wie Abbildung 25 zu entnehmen ist, erkannte mAb1F9 nach vorheriger Injektion von humAbAMA1 sein Epitop auf AMA1 nicht mehr (Zyklus 5 und 7). HumAbAMA1 und mAb4G2 schienen jedoch nicht zu konkurrieren (Zyklus 6), denn sie konnten gleichzeitig binden.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob humAbAMA1 und RON2 bzgl. der Bindung an AMA1 konkurrieren. Hierzu wurde AMA1 3D7 in unterschiedlichen Verhältnissen mit RON2sp1 inkubiert, einem Peptid, das dem Teil des RON2 entspricht, der in der hydrophoben Tasche des AMA1 bindet (VULLIEZ-LE NORMAND *et al.*, 2012). HumAbAMA1 wurde über einen Protein-A-Chip immobilisiert und die Bindung der AMA1:RON2sp1-Komplexe an humAbAMA1 analysiert. Abbildung 26 zeigt deutlich, dass humAbAMA1 sein Epitop umso schlechter erkennt, je größer die Menge des bei der Vorabinkubation eingesetzten RON2sp1. HumAbAMA1 und RON2 konkurrieren um die Bindung an AMA1.

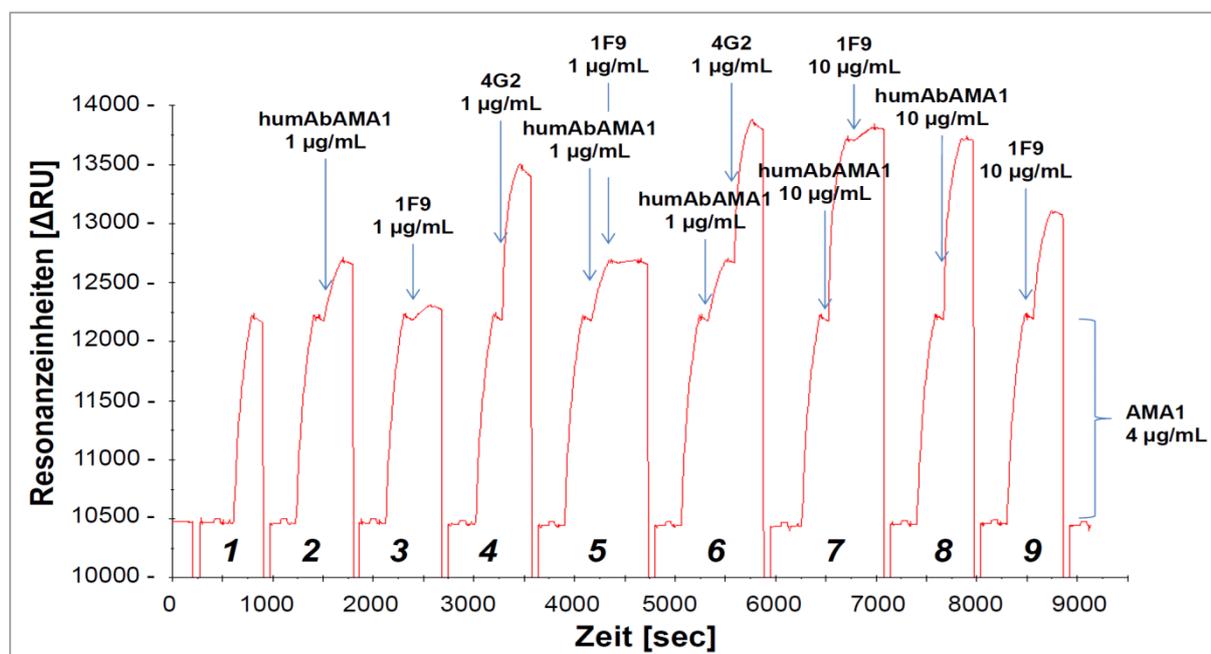


Abbildung 25: Kompetitionsmessungen mit AMA1 3D7, humAbAMA1, mAb1F9 und mAb4G2. Für diese Oberflächenplasmonresonanzmessung (II.2.1.9.) wurde AMA1 3D7 über eine regenerierbare Oberfläche gefangen, welche mit einem monoklonalen Antikörper (1D7) funktionalisiert ist. Mab1D7 erkennt AMA1 an einem Epitop fernab der hydrophoben Bindungsfurche des AMA1 und konkurriert nicht mit mAb1F9 und mAb4G2. Nach der Injektion und der Bindung des AMA1 (1750 RU) wurde entweder kein Antikörper (Zyklus 1), die zu testenden Antikörper einzeln (Zyklen 2-4, 8, 9) oder nacheinander (Zyklen 5-7) injiziert. Nach jedem Zyklus wurde der Chip regeneriert. Diese Oberflächenplasmon-resonanzmessungen wurden an einer T200 Biacore durchgeführt. Die Zyklusnummern (1-9) sind kursiv geschrieben.

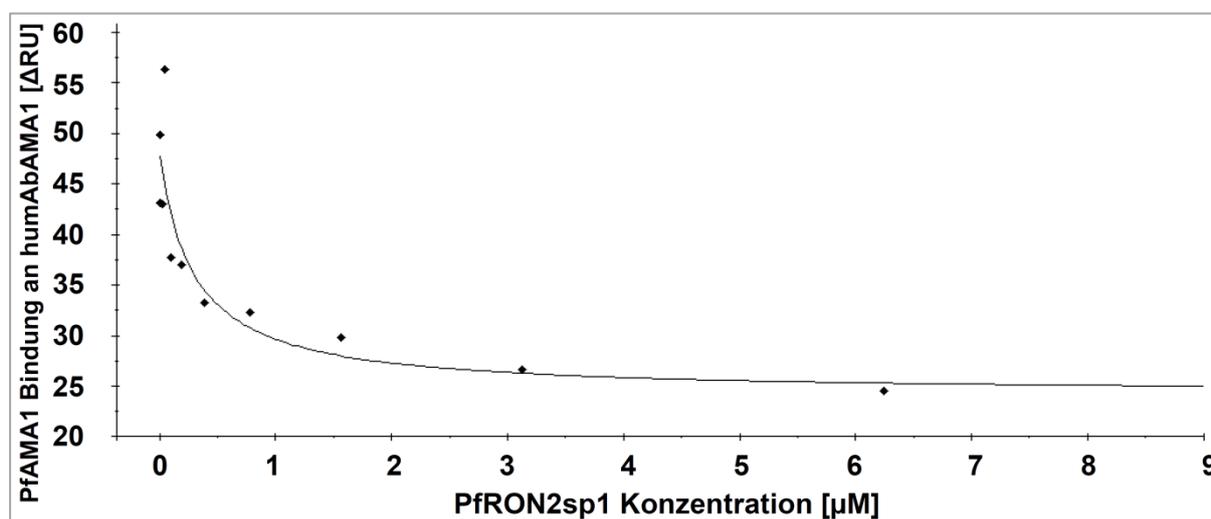


Abbildung 26: Kompetitionsmessung mit AMA1 3D7, RON2sp1 Peptid und humAbAMA1. Für diese SPR Messung (II.2.1.9.) wurde AMA1 3D7 mit einem Peptid inkubiert, welches jenem Teil des RON2 entspricht, welcher in der hydrophoben Bindungstasche des AMA1 bindet (vgl. VULLIEZ-LE NORMAND *et al.*, 2012). AMA1 und RON2sp1 wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt und vor der Oberflächenplasmonresonanzmessung eine Stunde lang inkubiert. Für jeden Datenpunkt wurde zunächst humAbAMA1 über einen Protein-A-funktionalisierten Chip gefangen (400 RU) und schließlich die AMA1:RON2sp1-Komplexe injiziert. Diese Analyse wurde an einem T200 Biacore Gerät durchgeführt und mithilfe der Software „BIAeval 4.0“ ausgewertet.

III.10. Wachstumsinhibitionstests

Um sich einen Einblick zu verschaffen, inwiefern die vier isolierten humanen Antikörper zum protektiven Immunglobulinrepertoire beitragen, wurden *in vitro* Wachstumsinhibitionstests mit verschiedenen *P. falciparum*-Stämmen durchgeführt (Abschnitt II.2.2.11.).

III.10.1. Inhibition durch MSP10-spezifische Antikörper humAb10.1, 10.2 und 10.3

Es zeigte sich bei jedem der drei Antikörper eine konzentrationsabhängige Hemmung, jedoch wurde in keinem Wachstumsinhibitionstests eine Inhibition von 100% mit den MSP10-spezifischen humAbs erreicht. Abbildung 27 stellt die Inhibition des *P. falciparum*-Stammes 3D7 in Abhängigkeit der rekombinanten MSP10-spezifischen IgG humAb10.1, 10.2 bzw. 10.3 dar.

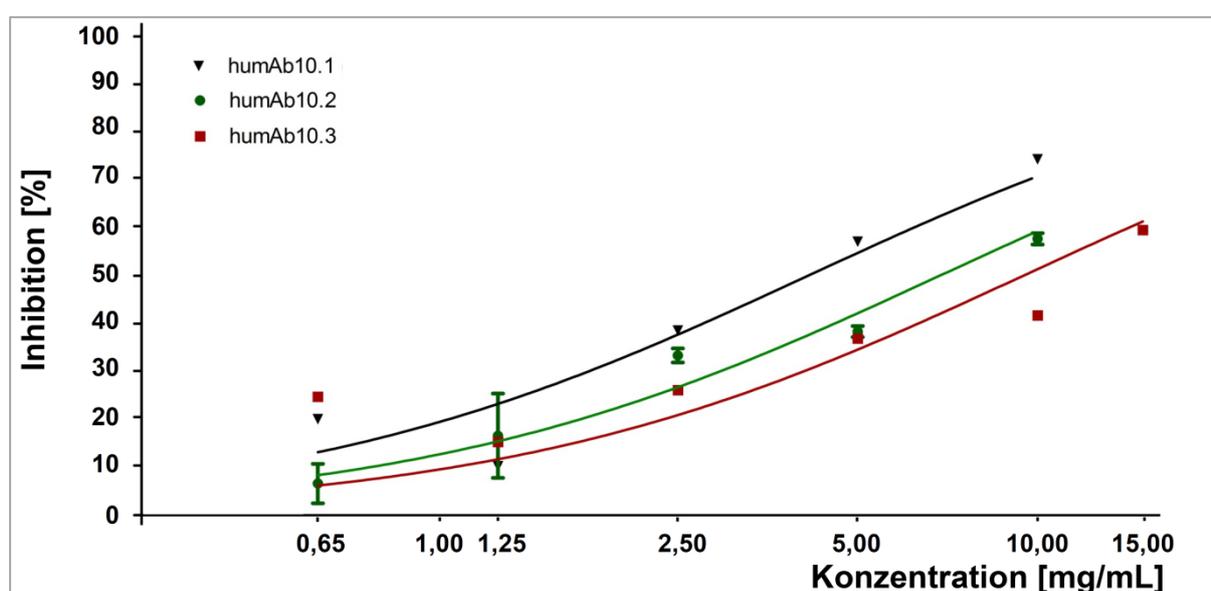


Abbildung 27: Wachstumsinhibitionstest rekombinant exprimierter MSP10-spezifischer humAbs mit *P. falciparum* 3D7. Für diese Wachstumsinhibitionstests (II.2.2.11.) wurde *P. falciparum* 3D7 dreimalig mit Sorbit synchronisiert und im Schizontenstadium mit 0,4% Parasitämie in 2% Hkt eingesetzt. HumAb10.1, 10.2 und 10.3 waren rekombinant in *N. benthamiana* produziert, über Protein-A-Chromatographie gereinigt und in RPMI 1640 mit 25 mM HEPES überführt worden. Die final eingesetzten Konzentrationen waren 15, 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,65 mg/mL. Als Positiv- und Negativkontrollen des Tests wurde polyklonales IgG von mit AMA1 immunisierter Kaninchen (BG98) und nicht immunisierter Kaninchen verwendet (je 6 mg/mL). Als Negativkontrolle für rekombinantes humanes IgG wurde gereinigter Antikörper 2G12 (10 mg/mL) verwendet. Die Platten wurden nach zwei Tagen geerntet. Die Proliferation der Parasiten wurde über die pLDH-Aktivität, d.h. die Entstehung des Farbstoffs NBF quantifiziert. Hierzu wurde die Extinktion bei 655 nm nach 30 min ausgelesen. Die Inhibitionswerte wurden bestimmt wie folgt: % Inhibition = $100 \times \frac{[E_{655 \text{ nm}} (\text{Probe}) - E_{655 \text{ nm}} (\text{RBK})]}{[E_{655 \text{ nm}} (\text{Schizonten}) - E_{655 \text{ nm}} (\text{RBK})]}$. Der Wert der BG98-Kontrolle lag bei 99,6% ($\pm 1,8\%$); die Werte der Negativkontrollen betragen -3,2% ($\pm 12,6\%$) (IgG nicht immunisierter Kaninchen) und -0,6% ($\pm 2,4\%$) (2G12).

Es wurden mehrere unabhängige Experimente mit unterschiedlichen Chargen gereinigten IgGs durchgeführt. Für humAb10.1 lag die maximale Inhibition bei 73,28% ($\pm 0,00\%$) mit 10 mg/mL, jene für humAb10.2 bei 58,69% ($\pm 1,68\%$) bei 10 mg/mL und jene des humAb10.3 bei 58,54% ($\pm 3,05\%$) bei 15 mg/mL. Tabelle 16 fasst die ermittelten EC_{50} -Werte

für den Stamm 3D7 zusammen. Die Fähigkeit der MSP10-spezifischen humAbs *P. falciparum in vitro* zu inhibieren, wurde außerdem mit zwei weiteren Stämmen, HB3 und Dd2, untersucht. Hier zeigte sich eine maximale Hemmung von 38,91% bei Stamm HB3 mit humAb10.1. Tabelle 17 gibt darüber einen Überblick.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Kennwerte der Wachstumsinhibition des *P. falciparum* 3D7 durch humAb10.1, 10.2 und 10.3. Die dargestellten Werte basieren auf den in Abbildung 27 veranschaulichten Dosis-Wirkungskurven der humAb10.1, 10.2 bzw. 10.3. Die EC₅₀-Werte wurden anhand der mit Wachstumsinhibitionstests (II.2.2.11.) ermittelten Dosis-Wirkungskurven bestimmt. Für Konzentrationsangaben in µM wurde ein Molekulargewicht von 150 kDa angenommen. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm „GraphPad Prism“ und dessen Algorithmus „log(agonist) vs. normalized response“.

Antikörper	humAb10.1	humAb10.2	humAb10.3
EC ₅₀	4,133 mg/mL (27,6 µM)	6,862 mg/mL (45,7 µM)	9,467 mg/mL (63,1 µM)
95% Konfidenzintervall	2,580 - 6,620 mg/mL	5,457 - 8,628 mg/mL	5,456 - 16,43 mg/mL

Tabelle 17: Inhibition der *P. falciparum*-Stämme HB3 und Dd2 durch humAb10.1, 10.2 und 10.3. Für diese Wachstumsinhibitionstests (II.2.2.11.) wurden alle Stämme dreimal synchronisiert und mit einer Parasitämie von 0,4% im Schizontenstadium eingesetzt. Die Kulturen wurden nach zwei Tagen Inkubationszeit geerntet. Die Quantifizierung der Proliferation in jedem Napf erfolgte mithilfe der pLDH-Aktivität. Die Bildung des NBF wurde nach 30 min durch Messung der Extinktion bei 655 nm ausgelesen. Die Inhibitionswerte wurden folgendermaßen berechnet: % Inhibition = 100 x [E_{655 nm} (Probe) - E_{655 nm} (RBK)] / [E_{655 nm} (Schizonten) - E_{655 nm} (RBK)]. Es sind Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen (in Klammern) von Dreifachbestimmungen angegeben.

Antikörper \ Stamm	humAb10.1		humAb10.2		humAb10.3	
	2,5 mg/mL	10 mg/mL	2,5 mg/mL	10 mg/mL	2,5 mg/mL	10 mg/mL
3D7	38,03% (± 2,58%)	73,28% (± 0,00%)	33,90% (± 2,11%)	58,69% (± 1,68%)	36,32% (± 4,51%)	41,73% (± 3,01%)
HB3	9,88% (± 0,71%)	38,91% (± 0,46%)	4,00% (± 4,39%)	38,35% (± 2,33%)	5,78% (± 1,34%)	29,36% (± 3,95%)
Dd2	5,17% (± 1,43%)	33,29% (± 4,93%)	3,32% (± 2,49%)	27,32% (± 0,70%)	0% (± 0,35%)	20,43% (± 0,92%)

III.10.2. Inhibition durch humAbAMA1

HumAbAMA1 zeigte bei allen getesteten *P. falciparum*-Stämmen eine konzentrationsabhängige Inhibition, die jeweiligen Dosis-Wirkungskurven unterschieden sich jedoch. Abbildung 28 veranschaulicht exemplarisch die Hemmung von *P. falciparum* 3D7, K1 und W2mef. Die stärkste Inhibition durch humAbAMA1 erfuhr Stamm 3D7 mit einem EC₅₀-Wert von 34,8 µg/mL. Mit 100 µg/mL war dieser Stamm bereits vollständig im Wachstum gehemmt. Wie aus Tabelle 18 hervorgeht, bewegten sich K1, FCR-3 und HB3 mit EC₅₀-Werten zwischen 120 und 250 µg/mL mit Mittelfeld. Die Stämme Dd2 und W2mef, welche sehr nah miteinander verwandt sind (GUINET *et al.*, 1996), wurden erst bei einer Konzentration von ca. 3,8 mg/mL halbmaximal inhibiert.

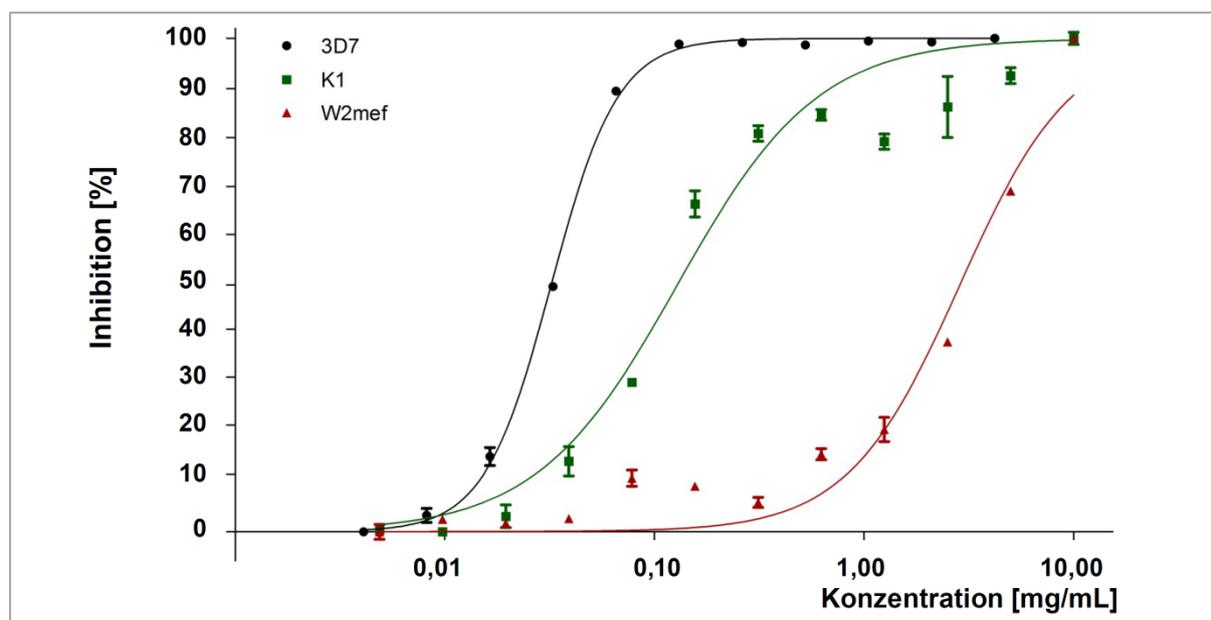


Abbildung 28: Wachstumsinhibition der *P. falciparum* Stämme 3D7, K1 und W2mef durch humAbAMA1. Sieben, fünf und drei Tage vor Ansetzen der Wachstumsinhibitionstests (II.2.2.11.) wurden *P. falciparum* 3D7, K1 und W2mef synchronisiert und mit einer Parasitämien von 0,5% eingesetzt. HumAbAMA1 wurde rekombinant in *N. benthamiana* hergestellt, über Protein-A-Chromatographie gereinigt und in MCM überführt. Als Positiv- und Negativkontrollen des Tests wurde polyklonales IgG aus mit AMA1 immunisierter Kaninchen (BG98) und nicht immunisierter Kaninchen genutzt. Als Negativkontrolle für rekombinantes humanes IgG wurde gereinigter Antikörper 2G12 verwendet. Nach zwei Tagen wurden die Platten geerntet. Die Proliferation der Parasiten wurde über ihre pLDH-Aktivität quantifiziert. Die Inhibitionswerte wurden wie folgt berechnet: % Inhibition = $100 \times [E_{655 \text{ nm}} (\text{Probe}) - E_{655 \text{ nm}} (\text{RBK})] / [E_{655 \text{ nm}} (\text{Schizonten}) - E_{655 \text{ nm}} (\text{RBK})]$. Die Datenpunkte und Fehlerbalken stellen Mittelwerte bzw. Standardabweichungen von Dreifachmessungen dar. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm „GraphPad Prism“ und dessen Algorithmus „log(agonist) vs. normalized response“. Die Werte der BG98-Kontrollen lag bei 93,6% (3D7), 101,9% (K1) und 91,2% (W2mef). Die Werte der Kontrolle mit IgG nicht immunisierter Kaninchen betragen 1,84% (3D7), 11,4% (K1) und 21,4% (W2mef). Die Negativkontrollen mit IgG 2G12 zeigten Inhibitionswerte von 3,1% (3D7), 4,0% (K1) bzw. -3,7% (W2mef).

Tabelle 18: EC₅₀-Werte des humAbAMA1 bei *P. falciparum* 3D7, K1, FCR-3, HB3, Dd2 und W2mef. Die Stämme wurden sieben, fünf und drei Tage vor Ansetzen der Wachstumsinhibitionstests (II.2.2.11.) synchronisiert und im Schizontenstadium mit einer Parasitämie von 0,5% (3D7, K1, W2mef, Dd2, HB3) bzw. 0,8% (FCR-3) eingesetzt. Nach zwei Tagen wurden die Platten geerntet. Das Wachstum der Parasiten wurde über die pLDH-Aktivität bestimmt. Für Konzentrationsangaben in nM und µM wurde ein Molekulargewicht des Volllängenantikörpers von 150 kDa angenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm „GraphPad Prism“ und dessen Funktion „log(agonist) vs. normalized response“.

Stamm	3D7	K1	FCR-3	HB3	Dd2	W2mef
EC ₅₀	34,9 µg/mL (233,67 nM)	132,7 µg/mL (884,67 nM)	264,7 µg/mL (1,76 µM)	189,0 µg/mL (1,26 µM)	3,80 mg/mL (25,33 µM)	3,86 mg/mL (25,73 µM)
95% Konfidenzintervall	29,37 - 43,84 µg/mL	112,7 - 156,4 µg/mL	194,8 - 359,7 µg/mL	151,5 - 235,7 µg/mL	3,00 - 4,81 mg/mL	2,40 - 6,20 mg/mL

III.10.3. Synergismusuntersuchungen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde deutlich, dass Stamm 3D7 sowohl von humAb10.1 als auch von humAbAMA1 inhibiert wird. Um synergistische Effekte der isolierten humanen Antikörper zu untersuchen, bot es sich daher an, eine Kombination von humAb10.1 und humAbAMA1 zu verwenden. Hierzu wurden diese IgG sowohl einzeln als auch in fünf verschiedenen $EC_{50}(\text{humAb10.1}):EC_{50}(\text{humAbAMA1})$ -Verhältnissen eingesetzt. In einem 50%-Isobologramm lässt sich der Unterschied zwischen erwarteter Inhibition bei LOEWE-Additivität und derjenigen Hemmung, die tatsächlich mit den Kombinationen beobachtet werden, darstellen (GRECO *et al.*, 1995; WILLIAMS *et al.*, 2012). In Abbildung 29 ist das entsprechende 50%-Isobologramm für *P. falciparum* bei Einsatz von humAbAMA1 und humAb10.1 veranschaulicht. Anhand der Trendlinie lässt sich das sog. HEWLETTs S bestimmen, welches ein Maß für die Synergie ist. Gemäß WILLIAMS *et al.* (2012) ist $S = ON / OM$, wobei Punkt O der Ursprung ist, Punkt N der Schnittpunkt von LOEWE-Additivitätslinie und Ursprungsgerade und Punkt M der Schnittpunkt von Trendlinie und Ursprungsgerade. Für humAbAMA1 und humAb10.1 ergibt sich für S ein Wert von 1,5625, da $S = \sqrt{(2 \times 50^2) / (2 \times 32^2)}$. Falls $S > 1$ deutet dies auf einen synergistischen Effekt hin; je größer S , desto stärker der synergistische Effekt (WILLIAMS *et al.*, 2012).

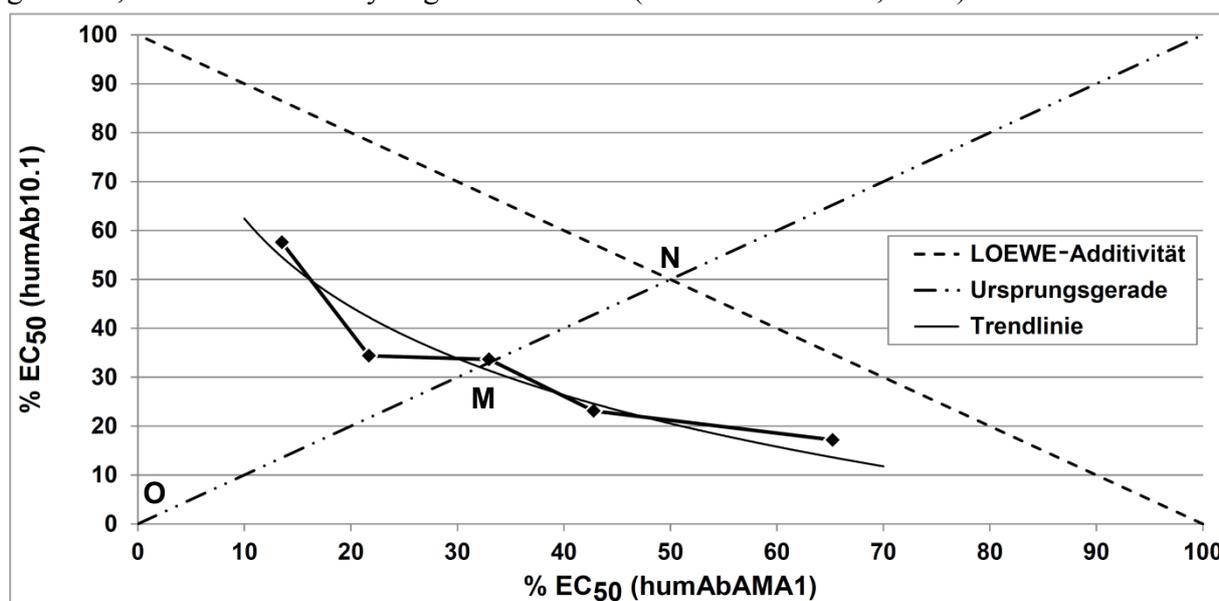


Abbildung 29: 50%-Isobologramm der Inhibition des *P. falciparum*-Stamms 3D7 durch Kombination von humAb10.1 und humAbAMA1. *P. falciparum* wurde dreimalig synchronisiert und mit einer Parasitämie von 0,5% im Schizontenstadium eingesetzt. HumAb10.1 und humAbAMA1 wurden sowohl einzeln als auch in $EC_{50}(\text{humAb10.1}) : EC_{50}(\text{humAbAMA1})$ Verhältnissen von 1,07:1,00; 1,60:1,00; 4,27:1,00; 1,00:1,87 bzw. 1,00:3,75 verwendet. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Platten geerntet. Die parasitäre Proliferation wurde über die Aktivität der pLDH über die Entstehung des Farbstoffs NBF quantifiziert. Hierzu wurde die Extinktion bei 655 nm nach 30 min ausgelesen. Die Inhibitionswerte wurden folgendermaßen berechnet: $\% \text{ Inhibition} = 100 \times [E_{655 \text{ nm}}(\text{Probe}) - E_{655 \text{ nm}}(\text{RBK})] / [E_{655 \text{ nm}}(\text{Schizonten}) - E_{655 \text{ nm}}(\text{RBK})]$. Die LOEWE-Additivitätslinie stellt jene 50%-Isobole dar, die zu erwarten wäre, würden die Antikörper einen reinen additiven Effekt haben. Die Ursprungsgerade dient der Veranschaulichung des Abstands der LOEWE-Additivitätslinie von der beobachteten 50%-Isobole der humAb10.1/ humAbAMA1 Kombinationen. Je größer dieser Abstand und je kleiner der Abstand zum Ursprung, desto stärker der synergistische Effekt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 als Gütemaß der Trendlinie der tatsächlichen 50%-Isobole beträgt 0,913.

III.11. Vergleich der AMA1-Sequenzen

Um einen Überblick darüber zu erhalten, inwiefern sich die verschiedenen AMA1-Allele voneinander und von den rekombinanten AMA1-Varianten DiCo 1, 2 und 3 unterscheiden, wurde ein Alignment durchgeführt. Abbildung 30 stellt das Ergebnis dieses Sequenzvergleichs dar.

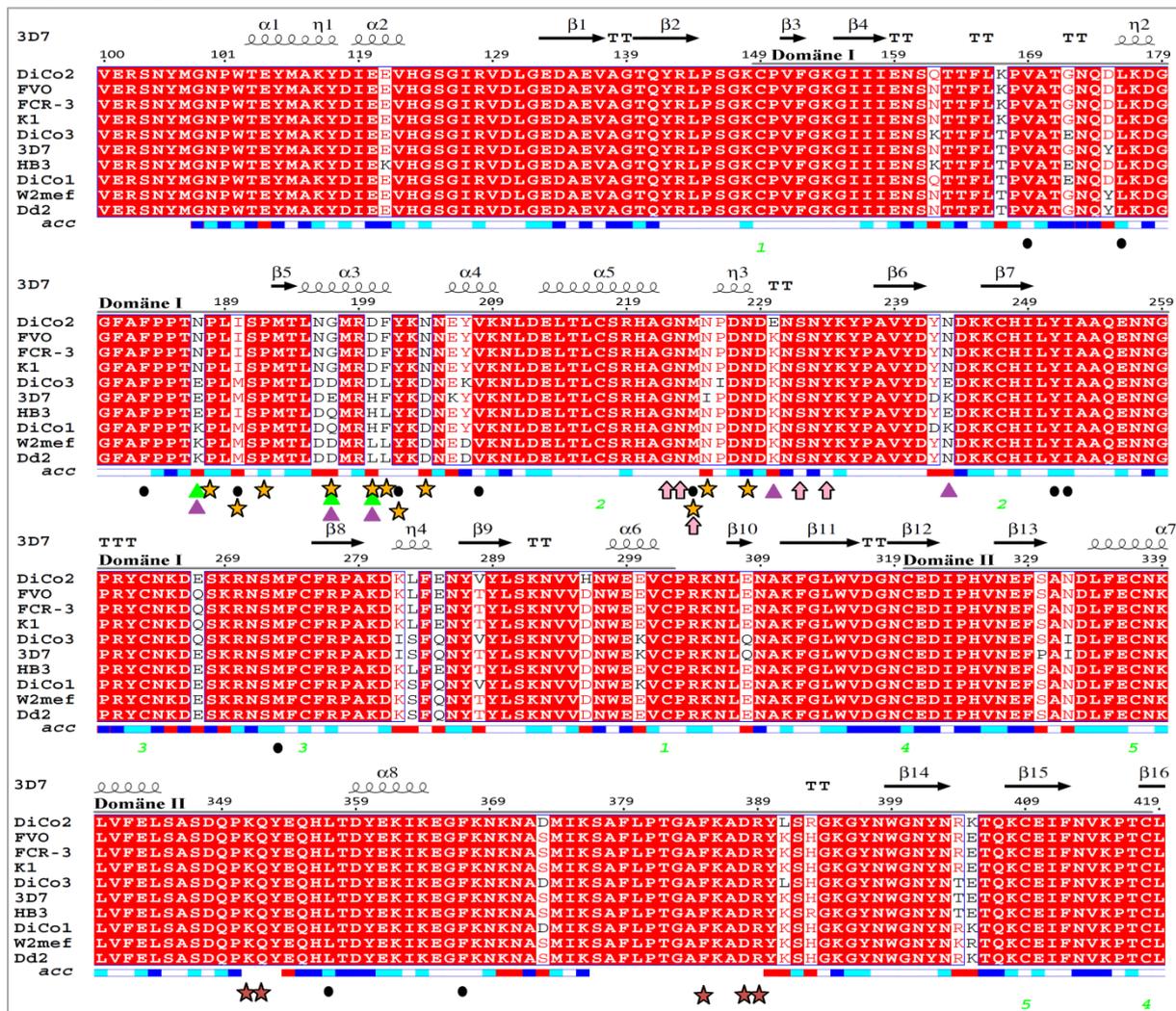


Abbildung 30: Vergleiche verschiedener *P. falciparum* AMA1-Sequenzen. Cysteinreste, die an Disulfidbrücken beteiligt sind, sind grün nummeriert. Solche Reste, welche die hydrophobe Bindungstasche bilden (COLEY *et al.*, 2007), mit der die hydrophobe Helix des RON2 gebunden wird, sind mit schwarzen Punkten markiert. Violette Dreiecke markieren hochpolymorphe Reste (BAI *et al.*, 2005; DUAN *et al.*, 2008). Aminosäurereste, die kritisch für die Interaktion des Antikörpers 1F9 mit AMA1 sind (COLEY *et al.*, 2007), sind mit Sternen (orange) gekennzeichnet. Reste, welche an der Bindung durch mAb4G2 beteiligt sind (PIZARRO *et al.*, 2005; COLLINS *et al.*, 2007), sind mit roten Sternen kenntlich gemacht. Grüne Dreiecke kennzeichnen jene drei Aminosäurereste, in denen sich das W2mef/Dd2-Allel des AMA1 sehr stark von allen anderen hier dargestellten Sequenzen unterscheidet. Jene fünf Aminosäurereste, die die Bindungstasche des Argininrests 2041 des RON2 bilden (VULLIEZ-LE NORMAND *et al.*, 2012), sind mit Pfeilen markiert. Die Sekundärstrukturinformation (PDB Eintrag 2Q8A (Kette A)) wurde mithilfe der Werkzeuge auf <http://esprout.ibcp.fr> auf das Alignment der AMA1-Sequenzen übertragen. Die Sequenzen wurden bezogen von <http://www.uniprot.org> (FVO (Q9TY48), K1 (Q25749), HB3 (Q25747), FCR-3 (P50490), Dd2 (B2LUX5)) und aus den Publikationen von HEALER *et al.* (2004) für AMA1 W2mef und von REMARQUE *et al.* (2008a) für „Diversity Covering“ (DiCo) AMA1-Sequenzen 1, 2 und 3. T: Turns; β: β-Stränge; α: α-Helices; η: 3_{10} -Helices. Domäne I und Domäne II gemäß HODDER *et al.* (1996) sind markiert.

IV. Diskussion

IV.1. EBV Transformation

IV.1.1. Optimierung der EBV Transformation

Bei den Untersuchungen der EBV Transformationsbedingungen (Abschnitt II.2.2.4.) mittels Vitalfärbung und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Opera System) sowie mithilfe der Messung humaner IgG Konzentrationen in den Zellkulturüberständen zeigten verschiedene Parameter einen positiven Einfluss.

IV.1.1.1. Medien, CpG ODN 2006 und holo-Transferrin

In Bezug auf die Transformationsrate gab es zwischen DMEM- und RPMI 1640-basiertem Medium keinen Unterschied, sofern keine Zusätze, CpG ODN 2006 oder holo-Transferrin, hinzugegeben wurden (Abbildung 10(A)). Bei Zugabe von CpG ODN 2006 wies DMEM jedoch signifikant höhere Transformationsraten auf. Holo-Transferrin zeigte in keinem der getesteten Medien einen nachweisbaren Einfluss auf die Transformationseffizienz. Weshalb DMEM-basiertes RPMI 1640-basiertem Medium überlegen ist, wenn CpG ODN 2006 hinzugegeben wird, kann nur vermutet werden. Die Zusammensetzungen von DMEM und RPMI 1640 unterscheiden sich stark, wenngleich beide als Vollmedien zu bezeichnen sind. DMEM ist in Bezug auf viele Komponenten reichhaltiger und könnte deshalb für bessere Wachstumsbedingungen gesorgt haben.⁵⁰ Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt darin, dass bestimmte Aminosäuren, wie Asparagin, Glycin, Serin, Prolin und Threonin, vor bestimmtem zellulärem Stress schützen können, der sich andernfalls negativ auf die Proliferation auswirken kann (DEZENGOTITA *et al.*, 2002). Proliferierende B Zellen haben außerdem einen erhöhten Bedarf an Glukose (HOLLEY *et al.*, 2013), allerdings unterscheiden sich die beiden verwendeten Medien nicht in deren Konzentration.

Bezüglich der Mengen sezernierten IgGs im Zellkulturüberstand zeichnete sich ab, dass die lymphblastoiden Zellen in DMEM mit 1,1 - 3,5 mg/L insgesamt mehr IgG sezernierten als in RPMI 1640 mit jeweils unter 0,5 mg/L (Abbildung 10(B)). Hier könnte der höhere Gehalt vieler Aminosäuren im DMEM zum Tragen gekommen sein.⁵¹ Neben der Beobachtung, dass sich DMEM positiv auf die IgG Sekretion auswirkte, zeigte sich in diesem Medium außerdem ein positiver Einfluss, wenn CpG ODN 2006 und holo-Transferrin einzeln oder in Kombination verwendet wurden. Die Beobachtung, dass CpG ODN 2006 die Proliferation der B Zellen anregt, ist konform mit dem Befund von TRAGGIAI *et al.* (2004). Auch dass CpG ODN 2006 die Antikörpersekretion stimulieren kann, ist bekannt (CHU *et al.*, 2000). CpG ODN 2006 ist ein TLR9-Ligand und polyklonaler B Zellaktivator (BERNASCONI *et al.*, 2002), vermag jedoch darüber hinaus auch auf Monozyten und T Zellen zu wirken (BAUER *et al.*, 1999). Folglich könnte sich CpG ODN 2006 sowohl direkt auf B Zellen als auch indirekt positiv auf Proliferation und Antikörpersekretion der lymphblastoiden Zellen ausgewirkt haben.

Holo-Transferrin ist ein Transportprotein, welches Fe^{3+} -Ionen zu binden vermag (CRICHTON und CHARLOTEAUX-WAUTERS, 1987). Es wird häufig Zellkulturmedien zugesetzt, um eine bessere Eisenversorgung zu gewährleisten. In serumfreiem Medium kann Transferrin die Proliferation etablierter lymphoblastoider Zellreihen (GORDON *et al.*, 1984; SHAW *et al.*, 1988) und die Antikörpersekretion muriner Hybridomzellen (ZHANG *et al.*, 2012) unterstützen. Dass humanes holo-Transferrin auch die Antikörpersekretion frisch etablierter lymphoblastoider Zellen in serumhaltigem Medium unterstützt, erscheint daher plausibel, wurde jedoch noch nicht publiziert.

Wie bei CpG ODN 2006 so kann bei holo-Transferrin angenommen werden, dass dieses auch auf indirektem Wege – über T Zellen, NK Zellen, Monozyten/ Makrophagen oder einer Kombination aus den genannten Zelltypen – seine positive Wirkung auf die Transformationsrate und Antikörpersekretion der transformierten B Zellen entfalten könnte.

IV.1.1.2. Versorgerzellen Kasumi-1 und DG-75

Bezüglich der Versorgerzellen zeigten Kasumi-1 und DG-75 Zellen einen positiven Einfluss auf die Transformationsrate (Abbildung 11(A)), allerdings sezernierten die in Gegenwart von DG-75 gebildeten Zellaggregate kein IgG (Abbildung 11(B)). Versorgerzellen können die Transformationeffizienz positiv beeinflussen, indem sie Zell-Zell-Kontakte vermitteln (TIEBOUT *et al.*, 1987) und lösliche, parakrin wirkende Faktoren abgeben (DIRMEIER *et al.*, 2003). Kasumi-1 Zellen wurden ursprünglich aus einem Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie isoliert (ASOU *et al.*, 1991); DG-75 Zellen stammen aus einem Patienten mit Burkitt Lymphom (BEN-BASSAT *et al.*, 1977). Bei beiden Zelllinien sind grundsätzlich beide Arten des stimulierenden Einflusses denkbar. In einem Vorabexperiment wurde festgestellt, dass konditioniertes Medium von Kasumi-1 Zellen, d.h. lösliche Faktoren, einen positiven Einfluss auf die EBV-bedingte Transformationsrate haben, konditioniertes Medium von DG-75 Zellen jedoch nicht.⁵² Zwar scheinen daher in erster Linie Zell-Zell-Kontakte für das Transformationsergebnis mit DG-75 verantwortlich, ein zusätzlicher Einfluss von direkten Zell-Zell-Interaktionen zwischen Kasumi-1 Zellen und PBMCs kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Interessant ist die Beobachtung, dass DG-75 Zellen als Versorgerzellen zwar die Bildung vitaler Zellaggregate fördern, jedoch kein humanes IgG im Überstand detektiert wird (Abbildung 11). Erklärbar ist dies damit, dass DG-75 entweder nicht nur die Proliferation von B Zellen sondern von weiteren Zelltypen stimulieren und/ oder die B Zellen bei Verwendung dieser Versorgerzellen lediglich kein IgG sezernieren.⁵³

Neben Kasumi-1 und DG-75 Zellen wurden weitere humane, bestrahlte Zelllinien auf ihre Eignung als Versorgerzellen getestet: Jurkat (Akute Lymphoblastische T Zelleukämie), Raji und Ramos (Burkitt Lymphom) sowie U-937 (Histiozytäres Lymphom). Hierbei zeigte sich jeweils ein negativer Effekt auf die Transformationeffizienz (nicht dargestellt). Dies spricht dafür, dass nicht die bloße Tatsache ausreicht, dass andere (humane) Zellen vorhanden sind, sondern, dass es erwartungsgemäß auf die Qualität der Signale der Versorgerzellen ankommt. Welcher Art diese Signale sind, bedarf weiterer Untersuchungen. In der Literatur finden sich außerdem keine Studien, die sich Kasumi-1, DG-75, Raji, Ramos oder U-937

Zellen als Versorgerzellen bei EBV Transformationen zunutze machten. Daher können die hier beobachteten Transformationsraten nicht vor dem Hintergrund der Ergebnisse anderer Forschergruppen reflektiert werden.

IV.1.2. EBV Transformation von B Lymphozyten semi-immuner Spender

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass – gemäß der Ergebnisse der Optimierungsversuche – DMEM-basiertes Medium mit holo-Transferrin (80 ng/mL), CpG ODN 2006 (2,5 µg/mL), Cyclosporin A (2 µg/mL), 15,6% (V/V) B95-8 Überstand und 200.000 bestrahlten Kasumi-1 Versorgerzellen am geeignetsten erschien, wurde dementsprechend versucht B Zellen semi-immuner Spender zu transformieren. Es stellte sich heraus, dass dies insofern nicht zielführend war, als keine der generierten lymphoblastoiden Zellkulturen spezifische Antikörper im Überstand aufwies.

Für diese Beobachtung gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen handelte es sich bei den Optimierungsexperimenten um Modellversuche, d.h. es wurden frische PBMCs zur Transformation verwendet. Es wäre nicht angebracht gewesen die PBMCs semi-immuner Spender zu Optimierungszwecken zu nutzen. Stattdessen hätten eingefrorene PBMCs eines europäischen Spenders Verwendung finden können. Es bestand jedoch kaum Grund anzunehmen, dass kryokonservierte PBMCs grundsätzlich schlechter zu transformieren seien als frische, da dies regelmäßig durchgeführt wird (vgl. SIMMONS *et al.*, 2007; BONSIGNORI *et al.*, 2011; STUBBS *et al.*, 2011; DI ZENZO *et al.*, 2012). Diese Annahme wurde bestätigt, denn die lymphoblastoiden Kulturen, die mit PBMCs semi-immuner Spender erzeugt wurden, wiesen Zellaggregate auf, die denen der vergleichbaren Optimierungstransformation ähnlich waren.

Ein weiterer Grund, weshalb diese Zellkulturen keine spezifischen Antikörper sezernierten, ist zum anderen darin zu finden, dass die EBV Transformation ein stochastischer Prozess ist. Nicht alle B Zellen werden infiziert (SUGIMOTO *et al.*, 2004) und nicht in allen infizierten B Zellen etabliert sich eine Latenz. Es kann ein lytischer Zyklus initiiert werden, sodass die betroffenen Zellen verloren gehen. Des Weiteren ist die transformierte B Zellpopulation, die latent infiziert ist, wiederum sehr heterogen in Bezug auf Proliferation, Antikörpersekretion und Lebensdauer. Folglich kann es zu Selektionseffekten kommen, bei denen wiederum Zellen aus der Population verschwinden und sich solche Zellen durchsetzen, die keine Antikörper sezernieren. Führt man sich nun vor diesem Hintergrund vor Augen, dass der Anteil der für ein bestimmtes Antigen spezifischen Gedächtnis B Zellen bei nur 0,06-0,16% der peripheren B Lymphozyten⁵⁴ liegen wird, so wird klar, dass die Wahrscheinlichkeit spezifische LCLs zu erhalten umso geringer ist, je mehr unspezifische B Zellen zusammen mit den spezifischen B Zellen transformiert werden.

Eine Möglichkeit, dieser Problematik zu begegnen, ist die durchflusszytometrische Anreicherung antigenspezifischer IgG⁺ / CD22⁺ B Zellen vor der Transformation mit fluoreszenzmarkierten Antigenen. Diese Herangehensweise war zielführend, da nun immerhin 4,44% der Kulturen bei der in Maastricht bzw. 8,05% in Aachen durchgeführten EBV Transformation spezifische Antikörper im Zellkulturüberstand zeigten. Bisher wurde die durchflusszytometrische Anreicherung spezifischer B Zellen vor der EBV Transformation

noch nicht beschrieben oder publiziert. STUBBS *et al.* (2011) transformierten IgG⁺ / CD22⁺ B Zellen nigerianischer Spender mit dem Ziel Antikörper zu generieren. Sie erhielten 10.752 lymphoblastoide Kulturen, von denen 16 Kulturen (0,15% von 10.752) die gewünschten MSP2-spezifischen IgG sezernierten. BONSIGNORI und Kollegen (2011) transformierten ca. 30.000 Gedächtnis B Zellen (3.750 Kulturen) einer HIV-positiven tansanischen Frau und fanden in vier Kulturen (0,11% von 3.750) IgG, welches sich wie gewünscht gegen das V2/V3 Epitop des HIV-1 gp120 Protein richtete. SIMMONS *et al.* (2007) setzten IgG⁺ / CD22⁺ B Zellen von vier vietnamesischen Spendern ein, um Antikörper zu erhalten, die H5N1 Influenzaviren erkennen. Von 11.000 lymphoblastoiden Kulturüberständen zeigten 15 (0,13% von 11.000) neutralisierende Aktivität gegen H5N1 Influenzaviren. Diese Prozentsätze von 0,11-0,15% sind um einen Faktor 29 bis 73 geringer als die mit 4,44% und 8,05% erreichten Anteile mit antigenspezifisch sortierten B Zellen. Es lässt sich zwar argumentieren, dass die Zellkulturüberstände in der vorliegenden Arbeit mit mehr als einem Antigen getestet wurden, jedoch können die Unterschiede nicht alleine darauf beruhen.⁵⁵ Somit lässt sich abschließend festhalten, dass die EBV Transformation (im engeren Sinne) mit vorheriger Anreicherung der antigenspezifischen B Lymphozyten – zumindest in Bezug auf den Anteil an Kulturen, die spezifische Antikörper sezernieren – als effizienter zu bezeichnen ist im Vergleich zu Transformationen, bei denen die gesamte IgG⁺ / CD22⁺ B Zellpopulation eingesetzt wird.

IV.2. Untersuchung der Klonalität lymphoblastoider Zellkulturen

Zur Analyse der Klonalität der erzeugten lymphoblastoiden Zellreihen dienten Spekatyping PCRs. Bei den in Maastricht transformierten Zellen des Spenders 0013 waren zwei Fünftel der Kulturen nach sieben Wochen monoklonal, die übrigen zeigten vier bis sieben Klone. Vor dem Hintergrund der Publikationen von RYAN *et al.* (2006) und FRAUSSEN *et al.* (2010) erscheint dieses Ergebnis plausibel. FRAUSSEN *et al.* (2010) fanden, dass ihre lymphoblastoiden Kulturen, die mit durchflusszytometrisch sortierten IgG⁺ / CD22⁺ B Zellen erzeugt worden waren, zu 70% monoklonal und zu 30% biklonal zu sein schienen.⁵⁶ RYAN *et al.* (2006) untersuchten die Entwicklung des Klonalitätsgrades von frisch etablierten lymphoblastoiden Zellreihen, die mit PBMCs generiert worden waren, über einen Zeitraum von acht Wochen. Die polyklonalen Kulturen entwickelten sich hier sukzessive zu oligoklonalen Kulturen mit drei bis zehn Klonen (RYAN *et al.*, 2006, Abbildung 1).

Die Spekatyping PCRs der LCLs der in Aachen durchgeführten EBV Transformation zeigten entweder keine Amplikons oder solche, die auf monoklonale oder triklonale Kulturen hinwiesen. Dass teilweise keine Produkte bei der Spekatyping PCR zu beobachten waren, kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte man argumentieren, die cDNS-Synthese sei suboptimal verlaufen. Dies kann jedoch nicht auf alle getesteten Zellkulturen zutreffen, denn aus den meisten, die bei der Spekatypinganalyse keine mRNS von Antikörpern zu enthalten schienen, wurden variable Bereiche gesichert. Dies traf auch für Kultur 1/E4 zu, aus der humAbAMA1 und eine weitere V_H-Sequenz eines IgG isoliert wurde. Es erscheint vielmehr so, als sei der Anteil der cDNS der schweren Ketten zu gering⁵⁷ und/ oder als seien die degenerierten Primersätze der Spekatyping PCRs suboptimal zur Vervielfältigung

affinitätsgereifter variabler Regionen. Dies vor allem deswegen wahrscheinlich, da viele der im Rahmen dieser Arbeit mit dem Primersatz von TILLER (TILLER *et al.*, 2008) gesicherten V-Regionen Mutationen in den Gerüstregionen oder gar in der Verbindungsregion (J_H -Region) trugen, in der der FAM-markierte Rückwärtsprimer binden soll. Auch RYAN *et al.* (2006) machten drauf aufmerksam, dass somatische Mutationen mit der Anlagerung der Spektratyping Primer beeinträchtigen können.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Fragmentanalyse zu Zwecken der Bestimmung der Klonalität lymphoblastoider Zellkulturen nur geeignet erscheint, wenn (1) ausreichend genomische DNS oder cDNS der Immunglobulinketten in die PCR eingesetzt werden können – so wie im Fall der expandierten lymphoblastoiden Zelllinien 5/E8 und 5/F6 – und (2) wenn die Gerüstregionen und die J_H -Region nicht zu stark mutiert sind.

IV.3. Sicherung der variablen Bereiche der humanen Antikörper aus lymphoblastoiden Zellreihen

Aus den in Maastricht transformierten Zellen des Spenders 0013 wurden neun V_H -Sequenzen gesichert, von denen eine auf ein V-Gensegment der V_{H1} -Familie (11,1%) und jeweils vier auf V-Gensegmente der V_{H3} - (44,4%) bzw. V_{H4} -Familie (44,4%) zurückgingen (vgl. Tabelle 21). Bei den zwölf aus Spender 0010 generierten V_H -Sequenzen basierten drei auf V-Gensegmenten der V_{H1} -Familie (25,0%), vier auf V-Gensegmenten der V_{H3} - (33,3%) und fünf variable Bereiche auf Gensegmenten der V_{H4} -Familie (41,7%) (vgl. Tabelle 23). Als Maß der Güte der Amplifikation humaner variabler Immunglobulindonmänen sollen hier jene Sequenzabschnitte der schweren Ketten dienen, welche auf die V_H -Gensegmente zurückgehen.

Von den sieben humanen V_H -Gensegmentfamilien (V_{H1} bis V_{H7}) tragen jene der V_{H2} -, V_{H6} - und V_{H7} -Familien nur selten zu funktionalen Antikörpern / B Zellrezeptoren bei (SHI *et al.*, 2014). Die V_{H1} -, V_{H3} - und V_{H4} -Familien besitzen die meisten funktionalen V_H -Gensegmente (PRITSCH *et al.*, 1999) und die Mehrzahl der schweren Immunglobulinketten der B Zellen des peripheren Bluts basieren auf V_{H1} -, V_{H3} - und V_{H4} -Gensegmenten (RAO *et al.*, 1999). Insofern erscheinen die beobachteten Anteile der V_H -Sequenzen der gesicherten variablen Bereiche plausibel und lassen kaum Grund zur Annahme, dass der verwendete Primersatz oder die Amplifizierungsstrategie dazu führten, dass V_H -Sequenzen einer bestimmten Familie bevorzugt oder gar nicht vervielfältigt würden. Der Stichprobenumfang ist mit neun und zwölf V_H -Sequenzen jedoch zu klein, um eine aussagekräftige statistische Analyse durchführen und folgern zu können, welche Amplifizierungsstrategie – sei es mit Primermischungen oder einzelnen Primerpaaren – besser geeignet ist. Eine weitergehende Effizienzbetrachtung der PCR und der Ausbeute an geeigneten, zu anti-plasmodialen Antikörpern gehörenden variablen Regionen, findet sich im folgenden Kapitel.

IV.4. Identifikation anti-plasmodialer humaner Antikörper und Effizienzbetrachtung

Bei der testweisen Expression zeigte sich, dass vier der Kombinationen von schweren und leichten Ketten plasmodiale Antigene erkannten. Drei waren spezifisch für MSP10, eine spezifisch für AMA1.

In Bezug auf die initiale Menge transformierter spezifischer IgG⁺ / CD22⁺ B Lymphozyten von 4.869 Zellen bei der Transformation in Maastricht und von 14.048 Zellen bei der Transformation in Aachen ergeben sich Ausbeuten von 0,0616% bzw. 0,0071%. Diese Prozentsätze erscheinen gering, sind jedoch vergleichbar mit jenen von BARFOD *et al.* (2007), SIMMONS *et al.* (2007), BONSIGNORI *et al.* (2011) und CORTI *et al.* (2013) mit 0,0014%, 0,0046%, 0,0139% bzw. 0,0263%.⁵⁸ Diese Gruppen isolierten humAbs gegen PfVAR2CSA, H5N1 Influenzaviren, HIV-1 und Paramyxoviren mittels EBV Transformation von B Zellpopulationen, die nicht antigenspezifisch sortiert worden waren. Andere Techniken, die kein EBV nutzen, sondern auf einer kurzzeitigen Stimulation von B Zellen mit konditioniertem Medium und mitogenstimulierten humanen T Zellen (WALKER *et al.*, 2009) oder mit IL-2- und IL-21-haltigem Medium und 3T3-msCD40L Versorgerzellen (HUANG *et al.*, 2012) beruhen, erzielten ähnliche Ausbeuten von 0,0066% (WALKER *et al.*, 2009) und 0,0030% (HUANG *et al.*, 2012). Auch hier waren die B Zellen nicht antigenspezifisch sortiert worden. Man sollte erwarten, dass bei vorheriger Anreicherung der spezifischen Zellen eine höhere Effizienz erzielt werden könnte, als wenn alle B Zellen – spezifische sowie unspezifische – eingesetzt werden. Auf den Ausgang einer EBV Transformation und die Ausbeute an antigenspezifischen Antikörpern haben verschiedene Parameter Einfluss. Vier hiervon sollen hier beleuchtet werden. (1) Zunächst wird die Qualität der PBMCs oder des Gewebes, aus dem die B Zellen stammen, eine Rolle spielen. Es ist anzunehmen, dass frisch entnommene Zellen besser zu transformieren sind als kryokonservierte, so wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzten Zellen. (2) Eine weitere Einflussgröße ist der Prozentsatz spezifischer B Zellen. Bei einer gerade erst abgeklungenen Infektion bspw. mit SARS- oder Influenzaviren wird der Anteil der B Zellen von Interesse möglicherweise größer sein (vgl. TRAGGIAI *et al.*, 2004; CORTI *et al.*, 2010a) als wenn eine symptomatische Phase der Krankheit, gegen welche Antikörper gefunden werden sollen, mehrere Jahre zurücklag. Im Fall der afrikanischen Spender, deren B Zellen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, war eine Anforderung jene, dass sie zwei Jahre keine klinischen Anzeichen einer Malaria gezeigt haben durften. Die Frequenz AMA1-spezifischer B Zellen – bezogen auf alle Gedächtnis B Zellen des peripheren Bluts – semi-immuner Spender kann bei lediglich 0,03-0,05% liegen (TRAORE *et al.*, 2009). (3) Wie bereits in Abschnitt IV.1.2. erläutert, ist die EBV Transformation eine Methode, die sehr vom Zufall und von Selektionseffekten bestimmt ist. Die Tatsache, dass 4,44% bzw. 8,05% der Kulturen spezifische Antikörper sezernierten (vgl. Abschnitte III.1.3. und IV.1.2.), verdeutlicht dies.^{59, 60} Schließlich werden nicht alle Zellen latent infiziert und transformierte Zellen, die keine Antikörper produzieren, haben einen Selektionsvorteil, da sie mehr Energie- und Nährstoffressourcen für die Zellteilung zur Verfügung haben. (4) Der vierte Punkt ist in der Effizienz der PCRs und der Eignung des Primersatzes zur Sicherung der variablen Regionen zu suchen. Dieser Aspekt wurde bereits im vorangegangenen Kapitel angesprochen.

In Bezug auf die Zugehörigkeit der gesicherten V_H -Regionen zu den V-Gensegmentfamilien $V_{H1} - V_{H7}$ ließ sich kein Unterschied zwischen der Methode mit Primermischungen und jener mit Primerpaaren feststellen (vgl. Abschnitt IV.3.). Ein weiterer Unterschied bei der Herangehensweise zur Sicherung variabler Bereiche lag darin, die in Aachen transformierten Zellen nicht zu expandieren, sondern direkt zur cDNS-Synthese zu verwenden. Die zugrundeliegende Überlegung war hier, dass bei der in Maastricht durchgeführten EBV Transformation und der sich anschließenden Expansion lediglich aus 2 von 90 Kulturen anti-plasmodiale Antikörper gesichert werden konnten. Neben der Gefahr, dass LCLs die Antikörpersekretion einstellen und die entsprechende mRNA nicht mehr gesichert werden kann, ist außerdem bekannt, dass EBV eine Vielzahl von nachteiligen Effekten auf die infizierten Zellen haben kann. Darunter findet sich – neben chromosomalen Aberrationen (COUNTER *et al.*, 1994; KATAOKA *et al.*, 1997) – auch die Aktivierung der AID („Activation-Induced Cytidine Deaminase“) (KOMORI *et al.*, 2006; LASKOV *et al.*, 2011). Somit ist bei längerer Kultivierung auch das Risiko gegeben, dass in variablen Bereichen weitere Punktmutationen eingeführt werden, die in frühzeitigen Stopkodons oder kritischen Veränderungen in Gerüstregionen und CDRs resultieren können. Der Verzicht auf die Expansion transformierter Zellen und die zeitnahe cDNS-Synthese erschienen daher sinnvoll. Trotzdem wurde aus den in Aachen transformierten 149 Kulturen nur aus einer Kultur ein anti-plasmodialer Antikörper generiert. Daher kann nicht geschlussfolgert werden, dass es in Bezug auf die Ausbeute gewünschter Antikörper effizienter war (a) die cDNS frühzeitig zu sichern und (b) Oligonukleotidpaare statt -mischungen des verwendeten Primersatzes zu nutzen.⁶¹ Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Ausbeuten anti-plasmodialer Antikörper von 0,0616% bzw. 0,0071% könnte im Primersatz selbst liegen. Wie unter Abschnitt IV.2. dargelegt, sind frisch transformierte Kulturen, die auf 50 Ursprungszellen zurückgehen, nach wenigen Wochen mono- bis heptaklonal. Man sollte daher annehmen, je eine bis sieben variable Regionen schwerer und leichter Ketten je Kultur identifizieren zu können. Jedoch wurde – trotz separat eingesetzter Primerpaare in der ersten PCR – häufig nur eine V_H -Sequenz isoliert. Die Anzahl der V_L -Sequenzen überstieg in einigen Fällen die Anzahl derer der schweren Ketten (vgl. Tabellen 21 bis 24). Dies ist ein Hinweis darauf, dass insbesondere der Satz an Oligonukleotiden zur Sicherung der V_H -Regionen Optimierungspotential birgt. Der Primersatz von TILLER (TILLER *et al.*, 2008) war bereits für die Sicherung der variablen Bereiche aus den Zellen der zweiten EBV Transformation (Spender 0010) um 17 V_H -spezifische und 7 V_K -spezifische Oligonukleotide erweitert worden (vgl. Tabelle 6). Darüber hinaus könnten weitere Primer verwendet werden, wie z.B. solche von SBLATTERO und BRADBURY (1998), CORONELLA *et al.* (2000) und WEITKAMP *et al.* (2003).

IV.5. Vergleich der affinitätsgereiften Antikörper mit ihren nicht mutierten Vorläufern

Die Vergleiche der kodierenden Sequenzen der variablen Bereiche der isolierten Antikörper mit ihren jeweiligen nicht affinitätsgereiften Vorläufersequenzen zeigten, dass die V_H -Regionen der Antikörper humAb10.2, humAb10.3 und humAbAMA1 auf der DNS-Ebene mindestens 43, 59 bzw. 39 Basenaustausche erfahren haben müssen (Tabelle 14).⁶²

Affinitätsgereifte humane Antikörper weisen durchschnittlich 15-20 somatische Mutationen in ihren assemblierten V_H-Regionen auf (TILLER *et al.*, 2007), während hochaffinitätsgereifte, hochpotente Antikörper 40-100 Mutationen in ihrem V_H-Bereich tragen können (KLEIN *et al.*, 2013). Daher sind humAb10.2, humAb10.3 und humAbAMA1 als hochaffinitätsgereift einzustufen. Die erforderliche Zeit, die die Affinitätsreifung dieser Antikörper *in vivo* in Anspruch genommen haben wird, lässt sich anhand der Anzahl der Mutationen approximieren. Es kann angenommen werden, dass eine erfolgreiche Affinitätsreifung *in vivo* mit 20 bzw. 30 produktiven Aminosäuremutationen in der V_L- bzw. in der V_H-Region mindestens vier Jahre dauert (DORIA-ROSE *et al.*, 2014).⁶³ Somit ergeben sich für humAb10.2 $\geq 2,4 - 3,2$ Jahre, für humAb10.3 $\geq 3,2 - 4$ Jahre und für humAbAMA1 $\geq 2 - 2,4$ Jahre.

Bei der Gegenüberstellung der Aminosäureabfolgen der V_H-Regionen der Antikörper humAb10.3 und humAbAMA1 und der entsprechenden nicht affinitätsgereiften Vorläufer zeigten sich besonders viele Mutationen in der Gerüstregion 3 (Abbildung 14). Dies erscheint zunächst kontraintuitiv. Während der somatischen Hypermutation in den Keimzentren, welche zufällig und ungerichtet ist, können zwar in der gesamten Sequenz der variablen Bereiche der schweren und leichten Immunglobulinketten Mutationen eingeführt werden. Jedoch führen Aminosäureaustausche in den Gerüstregionen als strukturgebenden Elementen häufiger zur Destabilisierung des BCR und können zum Verlust der dazugehörigen B Zelle führen (RAJEWSKY, 1996); folglich häufen sich Mutationen, die in Aminosäureaustauschen resultieren, vornehmlich in den CDRs und ermöglichen somit eine Affinitätsreifung des Paratops. Allerdings sind einige humane monoklonale Antikörper bekannt, die gerade in den Gerüstregionen solche Mutationen tragen, welche kritisch für die Bindungsfunktion sind. Insbesondere hochpotente HIV-1-spezifische Antikörper, sogenannte bnAbs („broadly neutralizing antibodies“), wie humAbs 2G12, VRC01, NIH45-46, PGT128 und PG16 weisen solche Eigenschaften auf (CALARESE *et al.*, 2003; DISKIN *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010; PEJCHAL *et al.*, 2010; KLEIN *et al.*, 2013). Den Gerüstregionen der variablen Bereiche kommen nicht nur strukturgebende Funktionen zu, sondern diese können außerdem (1) selbst an der Bindung des Epitops beteiligt sein, (2) die Ausrichtung der CDR-Schleifen zueinander beeinflussen und (3) für eine erhöhte Flexibilität sorgen, sodass verschiedene, sich ähnelnde Epitope erkannt werden können (KLEIN *et al.*, 2013). Die Beobachtung, dass in den V_H-Regionen der Antikörper humAb10.3 und humAbAMA1 außerdem ein bzw. zwei Prolinylrest(e) gegen Leucyl-, Serinyl- bzw. Glutamylreste *in vivo* ausgetauscht wurden (Abbildung 14), spricht für eine erhöhte Flexibilität dieser affinitätsgereiften Antikörper. Diese Frage könnte beantwortet werden (1) durch Rückmutation zur jeweiligen ursprünglichen Seitenkette und der Analyse der Bindungseigenschaften der Mutanten und/oder (2) durch die Strukturaufklärung der Fab-Regionen der humAb10.3 und humAbAMA1.

IV.6. Expression und Reinigung humaner Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten humanen anti-plasmodialen Antikörper wurden mittels Protein-A-Chromatographie sowohl aus Zellkulturüberständen als auch aus Rohextrakten transient transfizierter *N. benthamiana*-Pflanzen gereinigt (Abschnitt III.6.). Wie in Abbildungen 16 und 18 ersichtlich wird, waren die Antikörper intakt und frei von kontaminierenden Proteinen. Unter reduzierenden Bedingungen zeigten sich in Eluaten bei Coomassie-gefärbten PAA-Gelen und in entsprechenden Western Blots Banden von 50 kDa und 25 kDa apparenter Masse (Abbildung 16). Die Banden bei 50 kDa, welche schweren Immunglobulinketten entsprechen, zeigten einen Doublettencharakter. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass intakte IgG gereinigt wurden, deren schwere Ketten glykosyliert waren. Die in *N. benthamiana* produzierten Antikörper enthielten kein KDEL-Etikett (ein ER-Retentionssignal) (vgl. VITALE und DENECKE, 1999) und konnten daher Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Golgi-Apparat durchlaufen, um dort mit komplexen Glykanen posttranslational modifiziert zu werden. In Eukaryoten kann die im Golgi-Apparat angebrachte Glykosylierung sehr heterogen sein (LEROUGE *et al.*, 1998; HELENIUS und AEBI, 2001) und folglich kann dies in Proteinen unterschiedlicher Masse resultieren. Ein Lektinblot könnte genauere Auskunft darüber geben, welche Art von Glykanen oder terminalen Zuckergruppen die schwere Kette trägt. Unter nicht reduzierenden Bedingungen waren in den Eluaten mehrere Banden von mehr als 80 kDa in Coomassie-gefärbten Gelen und in Western Blots sichtbar. Da diese nur auf die 25 kDa und 50 kDa großen schweren (H) und leichten (L) Ketten zurückgehen konnten, konnte es sich dabei um H₂- (100 kDa), H₂:L- (125 kDa) oder H₂:L₂- (150 kDa) Komplexe (vgl. GIRITCH *et al.*, 2006) oder Multimere mit höherer molekularer Masse als 150 kDa handeln. Dies wurde in einer analytischen Gelfiltration untersucht (Abbildung 17), wobei sich zeigte, dass über 80% der eluierten Antikörper die richtige Zusammensetzung hatten (H₂:L₂).

Die Ausbeute der rekombinant produzierten humAbs war mit 35,3-74,1 mg/kg Blattmaterial ausreichend für den Einsatz in ELISA, SPR Messungen, IFA und Wachstumsinhibitionstests. Der Ertrag der humAbs bei Expression in *N. benthamiana* ließe sich dennoch steigern; in der Literatur finden sich für transient in Tabak exprimierte monoklonale Antikörper Ausbeuten von 50-760 mg/kg Blattmaterial (GIRITCH *et al.*, 2006; STRASSER *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2010; VÉZINA *et al.*, 2009; BOTH *et al.*, 2013).

Im Fall der lymphoblastoiden Zellkulturen konnten 10-15 mg Antikörper je Liter Überstand gewonnen werden. Zwar ist in der Literatur beschrieben, dass mit optimierten Zellen, wie HEK 293-6E oder CHO Zellen Antikörperausbeuten von bis 150 mg/L (WEST *et al.*, 2010) bzw. bis zu 4,7 g/L oder gar 12,6 g/L erzielt werden können (WURM *et al.*, 2004; ZOUWENGA *et al.*, 2010). Jedoch sollte man sich vor Augen führen, dass LCLs eher murinen Hybridomen ähneln als Hochleistungszelllinien. Hybridome sezernieren in einfachen Zellkulturflaschen 1-100 mg Antikörper je Liter Zellkulturüberstand (NILSANG *et al.*, 2007). BUCHACHER *et al.* (1994) beobachteten bei humanen LCLs Ausbeuten von durchschnittlich 21,7 mg/L (\pm 11,1 mg/L). Die Ausbeuten der humAb10.2 und 10.3 von 10-15 mg/L erscheinen daher plausibel. Möglicherweise hätte die Ausbeute durch andere Kultivierungsbedingungen gesteigert werden können, so z.B. mit DMEM-basiertem Medium

(vgl. Abschnitte III.1.1. und IV.1.1.1.) und anderen Kulturgefäßen. Jedoch war es nicht Ziel der vorliegenden Arbeit oder des Malaria Projekts die Antikörperausbeute der generierten LCLs zu optimieren. Da mit dem gewählten Funktionalitätstest (GIA) lediglich die Primärfunktion der Antikörper untersucht werden kann, sollten in Pflanzen exprimierte humAbs solchen aus Säugetierzellen in Bezug auf die bloße Neutralisation in nichts nachstehen (vgl. Abschnitt I.6.).

IV.7. ELISA und Dotblots

IV.7.1. ELISA und Dotblots zur Spezifitätsbestimmung der humanen monoklonalen Antikörper

Bei der Untersuchung der Spezifität der MSP10-spezifischen humAbs zeigte sich (Abbildung 19(A)), dass diese diskontinuierliche, d.h. konformationell abhängige Epitope des ersten bzw. des zweiten EGF-Motivs des MSP10 erkannten. Sie erkannten keine der anderen getesteten EGF-Motive des MSP1, MSP4 oder MSP8 und erschienen somit sehr spezifisch für MSP10 zu sein. Die Tatsache, dass die rekombinant exprimierten humAb10.1, 10.2 und 10.3 des ghanaischen Spenders 0013 diskontinuierliche Epitope der EGF-Motive wiedererkennen, erscheint vor Hintergrund der gedrungenen, kompakten Faltung der doppelten EGF-Domäne des MSP10 (vgl. Abbildung 3) plausibel. Darüber hinaus binden IgG aus Seren semi-immuner Spender, welche plasmodiale EGF-Motive erkennen, auch vornehmlich konformationelle Epitope (EGAN *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1999; BLACK *et al.*, 2001; 2003).

Die Tatsache, dass die rekombinanten Antikörper humAb10.2 und 10.3 dieselben Reaktivitäten zeigten wie die Kulturüberstände der lymphoblastoiden Zelllinien 5/E8 (humAb10.2) und 5/F6 (humAb10.3), aus denen sie entspringen, bestätigt, dass die korrekten V_H- und V_K-Sequenzen gesichert und kloniert wurden (Abbildung 19(B)). Interessant ist die Beobachtung, dass die Kombination aus H5/F6:κ5/E8 (humAb10.1) dieselbe Spezifität für MSP10-EGF1 wie humAb10.2 (H5/F6:κ5/F6) aufwies. Dies spricht dafür, (1) dass hier die schwere Immunglobulinkette mehr zu Spezifität und Bindung beiträgt als die leichte Kette und/ oder (2) dass die Paratop:Epitop-Interaktion tolerant gegenüber dem Austausch der leichten Kette ist. Die Affinität wurde durch diesen Austausch jedoch maßgeblich in Mitleidenschaft gezogen (vgl. Tabelle 15 und Abschnitt III.9.1.). Schwere Immunglobulinketten, im Besonderen deren CDRH2 und CDRH3, leisten in vielen Antikörpern den größten Beitrag zur freien Bindungsenergie (ROBIN *et al.*, 2014, Abbildung 4); insofern erscheint dieses Resultat plausibel. Im Gegensatz zu humAb10.1 und humAb10.2, welche beide MSP10-EGF1 erkannten, verlor die Kombination H5/E8:κ5/F6 (Abbildung 13(A)) gänzlich ihre Spezifität für MSP10-EGF2. Die leichte Kette des humAb10.3 (H5/E8:κ5/E8), welcher dieselbe schwere Kette trägt, scheint hier wichtiger zu sein als jene bei humAb10.2.

Im Fall des humAbAMA1, welcher aus Spender 0010 stammt, stellte sich ebenfalls heraus, dass dieser ein konformationelles Epitop erkannte (Abbildung 20). Auch das AMA1-

spezifische Serum-IgG des Spenders 0010 band hauptsächlich diskontinuierliche Bereiche des AMA1. PfAMA1 trägt insgesamt acht Disulfidbrücken (HODDER *et al.*, 1996); die meisten AMA1-spezifischen Antikörper semi-immuner Spender erkennen ebenfalls konformationelle Epitope (HODDER *et al.*, 2001).

IV.7.2. Reaktivität ghanaischer Seren mit MSP10 und AMA1

Um zu validieren, (1) ob die verwendeten rekombinanten plasmodialen Proteine richtig gefaltet sind, (2) ob die ghanaischen Spender eine repräsentative Stichprobe darstellen und (3) ob die generierten Antikörper repräsentativ sind für den IgG-Pool der semi-immunen Spender, wurden die ghanaischen Seren auf Reaktivität gegen MSP10-EGF, MSP10-EGF2 bzw. AMA1 3D7 – in nativer und reduzierter Form – getestet.

Da MSP10-EGF, MSP10-EGF2 und AMA1 3D7 von ghanaischen Seren erkannt wurden, gibt es kaum Grund zur Annahme, dass die rekombinanten Antigene nicht ihre natürliche Konformation besäßen (Abbildungen 21 und 22).

Hinsichtlich der Repräsentativität der Gruppe der Spender lässt sich festhalten, dass die Tatsache, dass AMA1 3D7 durch mehr als vier Fünftel der Seren wiedererkannt wurde (Abbildung 22), im Einklang damit ist, dass die meisten semi-immunen Individuen AMA1-spezifische Antikörper besitzen (THOMAS *et al.*, 1994; POLLEY *et al.*, 2004; CHELIMO *et al.*, 2005). Somit erscheint auch das Ergebnis, dass nicht einmal die Hälfte der 31 semi-immunen Spender das erste oder das zweite EGF-Motiv des MSP10 erkannte (Abbildung 21), plausibler. Die Beobachtung, dass die Reaktivität gegen AMA1 stärker/ häufiger ist als jene gegen die EGF-Motive des MSP10 kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass MSP10-spezifische Antikörper – im Gegensatz zu AMA1-spezifischen – nicht notwendigerweise essentiell sind, um eine protektive Immunantwort gegen *P. falciparum* aufzubauen/ aufrechtzuerhalten.⁶⁴ Bezüglich der Häufigkeit der Erkennung des PfMSP10 durch Seren semi-immuner Spender gibt es in der Literatur keine Vergleichsdaten. Bei MSP1₁₉ ist jedoch bekannt, dass nicht alle exponierten Individuen Antikörper gegen dieses doppelte EGF-Motiv aufweisen (TAYLOR *et al.*, 1996). Auch das EGF-Motiv des MSP4 wurde nicht von allen ghanaischen Seren (0001-0031) wiedererkannt.⁶⁵

Die meisten MSP10- und AMA1-spezifischen IgG der ghanaischen Spender 0001-0031 erkannten diskontinuierliche Determinanten ihrer Antigene (Abschnitt III.7.2.). Dieser Befund ist konform mit Ergebnissen von BLACK *et al.* (2003) und HODDER *et al.* (2001). Die Erkennung konformationeller Epitope des AMA1 scheint außerdem kritisch für eine protektive Immunantwort (CREWETHER *et al.*, 1996; ANDERS *et al.*, 1998; CORTÉS *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass alle im Rahmen dieser Arbeit generierten humanen Antikörper ebenfalls kontinuierliche Epitope des MSP10 bzw. des AMA1 wiedererkennen, lässt vermuten, dass humAb10.2, humAb10.3 und humAbAMA1 repräsentativ für das Immunglobulinrepertoire der ghanaischen Spender sind.

IV.8. Immunfluoreszenzmikroskopie

Um zu bestätigen, dass die isolierten humAbs die natürlichen, von Plasmodien exprimierten Antigene MSP10 bzw. AMA1 erkennen, wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von Schizonten und Merozoiten aufgenommen. Hierbei zeigte sich bei den MSP10-spezifischen humAbs eine Färbung, die mit einer Lokalisation an der äußeren Membran der sich entwickelnden Merozoiten vereinbar ist. Dies wird außerdem dadurch unterstützt, dass die Signale der MSP10- und MSP4-spezifischen Antikörper weitestgehend übereinstimmen – welches für eine Kolo-kalisation von MSP4 und MSP10 spricht. Sowohl MSP4 als auch MSP10 befinden sich an der Merozoitenoberfläche (MARSHALL *et al.*, 1997; BLACK *et al.*, 2003). Die Immunfluoreszenzaufnahmen von BLACK *et al.* ähneln jenen der in Abbildung 23(A) gezeigten stark (BLACK *et al.*, 2003, Abbildung 4(B)).

Bei der Färbung mit humAbAMA1 zeigte sich sowohl in freien als auch in reifenden Merozoiten ein starkes Signal am Ende eines jeden Merozoiten (Abbildung 23(B) und (C)). Dies ist mit der charakteristischen apikalen Lokalisation des AMA1 vereinbar. Darüber hinaus wiesen einige freie Merozoiten eine leichte Färbung der äußeren Membran auf, welche mit der Umverteilung von AMA1 nach der Freisetzung der Merozoiten konform geht (DUTTA *et al.*, 2003). Die mit humAbAMA1 generierten Immunfluoreszenzaufnahmen stimmen mit publizierten Daten überein (HODDER *et al.*, 2001, Abbildung 1; DUTTA *et al.*, 2003, Abbildung 5).

Folglich kann angenommen werden, dass die generierten humAbs nicht nur ihre jeweiligen rekombinant produzierten plasmodialen Antigene erkennen, sondern auch die entsprechenden authentischen, von *P. falciparum* exprimierten Proteine.

IV.9. Affinitäten natürlich und rekombinant exprimierter humaner Antikörper

IV.9.1. Affinitäten der MSP10-spezifischen Antikörper

Bei den Oberflächenplasmonresonanzmessungen zeigten die generierten MSP10-spezifischen humAbs Affinitäten zwischen $9,27 \times 10^{-7}$ M und $6,88 \times 10^{-10}$ M (Tabelle 15). Bisher sind noch keinerlei MSP10-spezifische monoklonale Antikörper beschrieben worden; dementsprechend fehlen direkte Vergleichswerte zur Affinität. Anti-plasmodiale Antikörper mit anderen Spezifitäten, wie etwa gegen PfRh5, MSP3 oder MSP1 jedoch zeigen ähnliche K_D -Werte zwischen $2,0 \times 10^{-8}$ M und $3,0 \times 10^{-10}$ M (LUNDQUIST *et al.*, 2006; CHENG *et al.*, 2007; DOUGLAS *et al.*, 2014). Generell wird angenommen, dass *in vivo* affinitätsreifende Antikörper nur in Ausnahmefällen eine höhere Affinität (K_D) als 10^{-11} M erreichen, da die Assoziation (k_a) diffusionslimitiert ist und die Optimierung der Dissoziationsrate (k_d) durch die Internalisierung von BCR und daran gebundenem Antigen begrenzt ist (FOOTE und MILSTEIN, 1991; BATISTA und NEUBERGER, 1998; KLEIN *et al.*, 2013).

Die geringste Bindungsstärke der im Rahmen dieser Arbeit isolierten MSP10-spezifischen Antikörper wies humAb10.1. auf, welcher die schwere Kette des humAb10.2

und die leichte Kette des humAb10.3 trägt. HumAb10.2, welcher die gleiche Spezifität, jedoch die authentische Paarung von schwerer und leichter Kette besitzt, band um den Faktor 170 stärker. Dies erscheint aus folgendem Grund nachvollziehbar. Die variablen Bereiche der schweren und leichten Ketten eines BCR (1) bestimmen gemeinsam das Paratop und dessen Komplementarität und Spezifität für das Zielantigen und (2) erfahren bei einer somatischen Hypermutation *in vivo* simultan Mutationen, die in einer erhöhten Affinität resultieren können. Die Wahrscheinlichkeit, dass nun eine Kombination von schwerer und leichter Kette, die nicht zusammen selektiert wurden, dieselbe oder eine höhere Bindungsstärke zeigt wie/als die authentische Kombination, ist daher als sehr gering einzustufen.⁶⁶

Bezüglich der Affinität des humAb10.3 zeigte sich, dass der von B Zellen produzierte signifikant affiner war als der rekombinant in Tabak hergestellte (Tabelle 15). Dieser Unterschied könnte auf das Expressionssystem selbst zurückzuführen sein. Generell gelten höhere Pflanzen als Expressionssystem für Antikörper als geeignet, da sie die meisten der in Säugetieren vorkommenden posttranslationalen Modifikationen durchführen können (GOMORD und FAYE, 2004; WEBSTER und THOMAS, 2012), ihre Endomembransysteme und Sekretionswege denen in Säugetierzellen sehr ähnlich sind (VITALE und PEDRAZZINI, 2005; HUANG *et al.*, 2010) und sie im ER das evolutionär stark konservierte Chaperon BiP besitzen, welches in Säugetieren für die korrekte Faltung von IgG mitverantwortlich ist (FEIGE *et al.*, 2009; 2010; NUTTALL *et al.*, 2002; SCHNEIDER *et al.*, 2014). In Bezug auf die Unterschiede der posttranslationalen Veränderungen in Pflanzen und Säugetieren liegt das Hauptaugenmerk häufig auf der N-Glykosylierung. Jedoch verursacht diese, an den C_{H2}-Domänen von IgG angebrachte Modifikation keine Bindungs- oder Affinitätsunterschiede (WRIGHT und MORRISON, 1997; RUDD *et al.*, 2001). Dies wird außerdem dadurch bestätigt, dass es eine Vielzahl von Antikörpern gibt, die in Pflanzen produziert wurden, funktional sind und dieselben Bindungs- und Neutralisationseigenschaften zeigen wie ihre jeweiligen entsprechenden Gegenstücke aus Säugetieren (vgl. z.B. MA *et al.*, 1994; YUSIBOV *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013). Es erscheint wahrscheinlicher, dass eine andere Art posttranslationaler Modifikation als die N-Glykosylierung, die Sulfatylierung von Tyrosinresten, für die Affinitätsunterschiede verantwortlich sein könnte. Tyrosinsulfatylierungen finden sich bei verschiedenen Proteinen in Säugetieren, wie z.B. bei Gerinnungsfaktoren, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (CCR5, CCR2B, CXCR4, CX3CR1) und Adhäsionsmolekülen (MOORE, 2003). Bei Antikörpern ist die Tyrosinsulfatylierung bisher nur bei HIV-1-spezifischen humAbs, die ein breites Wirkungsspektrum haben (bnAbs), bekannt (PEJCHAL *et al.*, 2010). Die Sulfatylierung der Tyrosinreste in ihren hypervariablen Regionen ist dabei von funktioneller Relevanz, denn diese ist kritisch für die Bindung und Neutralisation von HI-Virionen (PEJCHAL *et al.*, 2010). Diese Art der posttranslationalen Veränderung findet nicht in Pflanzen statt (MOORE, 2009), jedoch wird sie – sofern bestimmte Aminosäuresequenzmotive vorhanden sind – in Säugetierzellen auf der trans-Seite des Golgi-Apparats vorgenommen. Eine bioinformatische Analyse der schweren und leichten Ketten des humAb10.3 ergab, dass dessen CDRH1 an zwei Stellen und dessen FR_κ3 kurz vor der CDR_κ3 an einer Stelle sulfatyliert werden können (vgl. Abbildung 14(B)). Es war jedoch nicht möglich, etwaige Sulfatreste an den Tyrosinresten des humAb10.3 eindeutig

nachzuweisen – weder mithilfe eines Sulfotyrosin-spezifischen Antikörpers (vgl. KEHOE *et al.*, 2006) im Western Blot noch mittels Massenspektrometrie (nicht dargestellt). Durch die massenspektrometrische Messung wurde jedoch bestätigt, dass der in Tabak produzierte humAb10.3 dieselbe Aminosäuresequenz trägt wie jener aus B Zellen. Die Affinitätsunterschiede können folglich nicht auf Unterschiede in der Aminosäureabfolge zurückgeführt werden.

Die Produktion von humAb10.3 in Säugetierzellen, wie HEK und/ oder CHO Zellen, in welchen die Tyrosinsulfatylierung stattfinden kann, könnte geeigneter sein und könnte darüber hinaus Aufschluss geben, ob noch weitere Faktoren für die geringere Affinität des pflanzenexprimierten humAb10.3 verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu humAb10.3 zeigten sich bei humAb10.2 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der jeweiligen k_a -, k_d - und K_D -Werte des in Pflanzen produzierten Antikörpers und des natürlich von B Zellen exprimierten Pendants. Dies bestätigt, dass die Expression in *N. benthamiana* der Anforderung gerecht werden kann funktionale Volllängen-IgG1 zu produzieren, welche dieselben Bindungseigenschaften zeigen wie die entsprechenden, natürlich sezernierten Antikörper (vgl. z.B. MA *et al.*, 1994; YUSIBOV *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013).

IV.9.2. Affinität und Spezifität des AMA1-spezifischen Antikörpers

Die Affinitäten des humAbAMA1 für AMA1 3D7, FCR-3, HB3, DiCo 1, 2 und 3 lagen zwischen $4,78 \times 10^{-8}$ M und $1,88 \times 10^{-10}$ M (Abbildung 24). Hier gibt es zwei AMA1-spezifische inhibitorische Antikörper aus Nagetieren, mAb1F9 und mAb4G2, die zum Vergleich herangezogen werden können. Die Affinität des mAb1F9 für AMA1 3D7 liegt bei $1,3 \times 10^{-9}$ M, die des mAb4G2 bei $3,3 \times 10^{-9}$ M (BOES *et al.*, 2014). Damit bindet mAb1F9 um den Faktor 6,9 und mAb4G2 um den Faktor 17,6 schwächer als humAbAMA1 an dasselbe Antigen, AMA1 3D7.

IV.9.3. Kompetitionsmessungen

Um das Epitop des humAbAMA1 einzugrenzen, wurden Kompetitionsmessungen durchgeführt. Die Feststellung, dass der murine Antikörper 1F9 nicht mehr effizient an AMA1 zu binden vermochte, wenn humAbAMA1 bereits gebunden hatte (Abbildung 25, Zyklus 5 und 7), kann zweierlei bedeuten. Entweder die Epitope der beiden Antikörper überlappen und/ oder humAbAMA1 induziert eine Konformationsänderung, die mit einer Verzerrung der Bindungsstelle des mAb1F9 einhergeht. Da mAb1F9 in der hydrophoben Tasche des AMA1 und an daran angrenzende Bereiche bindet (COLEY *et al.*, 2007), lag die Vermutung nahe, dass humAbAMA1 ebenfalls dort binden könnte und somit ebenfalls die Interaktion von AMA1 und RON2 (vgl. Abbildung 5) hemmt. Eine weitere Messung, die mit AMA1:RON2sp1-Komplexen durchgeführt wurde (Abbildung 26), bestätigte, dass humAbAMA1 und RON2 um die Bindung an AMA1 konkurrieren. Es erscheint daher sehr wahrscheinlich, dass humAbAMA1 – so wie mAb1F9 und mAb4G2 (COLEY *et al.*, 2006; 2007; COLLINS *et al.*, 2007; 2009) – die für die Invasion der Wirtszellen essentielle

Wechselwirkung von AMA1 und seinem Liganden stört. Ob humAbAMA1 RON2 aus dem AMA1:RON2-Komplex verdrängen kann, wie es für mAb1F9 und mAb4G2 beschrieben wurde (SRINIVASAN *et al.*, 2011), bleibt zu klären.

Die Tatsache, dass humAbAMA1 alle getesteten AMA1-Varianten zu erkennen vermochte, mAb1F9 AMA1 DiCo 2 und DiCo 3 jedoch nicht (Holger Spiegel, persönliche Kommunikation), lässt vermuten, dass (1) humAbAMA1 entweder ein größeres Epitop erkennt, zu dem mehr konservierte Reste beitragen, als es bei mAb1F9 der Fall ist und/ oder (2) dass humAbAMA1 toleranter gegenüber polymorphen Aminosäureresten ist als mAb1F9. MAb1F9 bindet zwei der sechs hochpolymorphen Reste des AMA1 (vgl. Abbildung 30) und vermag daher bspw. AMA1 3D7 zu binden, erkennt AMA1 W2mef jedoch nicht (COLEY *et al.*, 2007). Eine durch Flexibilität bedingte Anpassungsfähigkeit an hochpolymorphe Reste findet man bei einigen HIV-1-spezifischen bnAbs, wie humAb3BNC60 oder humAb3BNC117, welche ein Epitop nahe/ in der fünften variable Schleife (V5) des gp120 erkennen (KLEIN *et al.*, 2013). Diese Antikörper tragen Mutationen in der dritten Gerüstregion der V_H-Domäne, die die Struktur des β -Faltblatts (C'C'CFG) lockern und den C'- und C''-Strängen mehr Flexibilität erlauben, um der Sequenzheterogenität des Epitops gerecht werden und somit verschiedene HIV-1-Quasispezies neutralisieren zu können (KLEIN *et al.*, 2013). Die Tatsache, dass humAbAMA1 viele Mutationen in der dritten Gerüstregion der V_H-Domäne erfahren hat (vgl. Abschnitt III.5., Abbildung 14(C)), zwei Prolinreste in der V_H-Region mutiert wurden (Abbildung 14, rote Kreise) und humAbAMA1 alle getesteten AMA1-Varianten erkannte (Abbildung 24), spricht für eine vergleichbare Funktionsweise. Dies kann durch Strukturaufklärungen von freiem humAbAMA1(Fab) und von humAbAMA1(Fab):AMA1-Komplexen näher untersucht werden.

IV.10. Wachstumsinhibitionstests

Die Funktionalität der generierten Antikörper wurde mithilfe von standardisierten *in vitro* Wachstumsinhibitionstests untersucht. Hierbei zeigten sich große Unterschiede zwischen MSP10- bzw. AMA1-spezifischen humanen Antikörpern.

IV.10.1. MSP10-spezifische Antikörper humAb10.1, 10.2 und 10.3

Die MSP10-spezifischen Antikörper inhibierten nur Stamm 3D7 zu 50% bis 73% bei einer Konzentration von 10 mg/mL (Abbildung 27 und Tabelle 16), wobei humAb10.1 die höchste Inhibition zeigte. Die Stämme HB3 und Dd2 wurden ebenfalls von humAb10.1 am stärksten gehemmt, allerdings nur mit ca. 39% bzw. 33%. Man könnte den Grund für diese Unterschiede zunächst in der Sequenz des doppelten EGF-Motivs des MSP10 suchen. Zwar ist dessen Sequenz im Vergleich zu vielen anderen *P. falciparum*-Proteinen sehr konserviert, es gibt jedoch Unterschiede in wenigen Aminosäureresten (TETTEH *et al.*, 2009; PACHECO *et al.*, 2012). Die Sequenz der Stämme 3D7 und HB3 ist identisch. Das doppelte EGF-Motiv des Stamms Dd2 jedoch unterscheidet sich von HB3 und 3D7 durch einen Aminosäurerest im zweiten EGF-Motiv; statt eines Histidylrests trägt dieser Stamm einen Glutaminylrest an Position 489 (H₄₈₉Q). Folglich kann der Grund für den unterschiedlichen Grad der Hemmung nicht (allein) darin liegen. Weitere Erklärungsmöglichkeiten sind zu suchen (A) in der

Funktion des doppelten EGF-Motivs des MSP10, (B) in der Redundanz der Interaktionen der *P. falciparum*-Merozoiten mit Erythrozytenoberflächenmolekülen zum Zweck des Aufbaus des initialen Kontakts und der Invasion und (C) in den Unterschieden der Vorlieben verschiedener *P. falciparum*-Stämme für bestimmte Invasionswege.

IV.10.1.1. Rolle des MSP10

Zwar ist nicht vollständig geklärt, welche Rolle MSP10 und dessen EGF-Motive spielen. Die Tatsachen, dass (a) Peptide des doppelten EGF-Motivs des MSP10 an Erythrozyten binden und die Invasion beeinträchtigen können (PUENTES *et al.*, 2005) und dass (b) sich MSP1 und MSP10 ähneln bzgl. der Struktur ihrer doppelten EGF-Domänen, ihrer Expressionsfenster (vgl. Abbildung 31; BOZDECH *et al.*, 2003; BLACK *et al.*, 2003) und ihrer Lokalisation an der gesamten Merozoitenoberfläche, sprechen jedoch dafür, dass MSP1 und MSP10 eine homologe Funktion im Invasionsprozess zukommt. Es wird angenommen, dass MSP1₁₉ zusammen mit MSP9 mit dem erythrozytären Protein Bande 3 (auch Anionenaustauscher 1, AE1) interagiert und dieses als Rezeptor nutzt (GOEL *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004; KARIUKI *et al.*, 2005). Ob MSP10 denselben Rezeptor nutzt, bleibt zu klären.^{67, 68} Es sind bereits verschiedene Antikörper gegen MSP1₁₉ beschrieben worden. Einige hiervon sind inhibitorisch – wie die murinen Antikörper mAb12.8 und mAb12.10 (MCBRIDE und HEIDRICH, 1987; NGOUNDOU-LANDJI *et al.*, 2010) – andere, wie z.B. mAb5.2 hingegen nicht (LI *et al.*, 2010). Auch MSP1₁₉-spezifische Antikörper semi-immuner Spender sind nicht in jedem Falle hemmend (MORGAN *et al.*, 2004). Interessanterweise sind selbst solche MSP1₁₉-spezifischen Antikörper, welche inhibitorisch sind, nicht dazu fähig, die Merozoiteninvasion vollständig zu hemmen (DREW *et al.*, 2005).⁶⁹ Diese Tatsache scheint auch für die hier beschriebenen humAbs zuzutreffen, da eine 100%-ige Inhibition nie erreicht wurde.

Neben der Invasionsinhibition vermögen MSP1₁₉-spezifische Antikörper Plasmodien durch mindestens zwei weitere Wirkprinzipien zu hemmen: durch die Beeinträchtigung der Prozessierung des MSP1 und der intraerythrozytären Entwicklung (MOSS *et al.*, 2012). MSP10 wird ähnlich wie MSP1 proteolytisch prozessiert (BLACK *et al.*, 2003), es ist jedoch nicht klar, welche Protease dafür verantwortlich ist oder ob MSP10 gar autoproteolytische Aktivität besitzt.⁷⁰ Auch ist nicht klar, ob MSP10 nur in späten Trophozoiten-/Schizontenstadien, d.h. intraerythrozytär und folglich außerhalb der Reichweite von Antikörpern gespalten wird oder auch extraerythrozytär, d.h. nach der Freisetzung der Merozoiten. Darüber hinaus ist zwar für MSP1₁₉, jenes GPI-verlinkten C-terminalen Spaltprodukts, das das doppelte EGF-Motiv trägt, bekannt, dass es mit in die neuinfizierten roten Blutkörperchen getragen wird (BLACKMAN *et al.*, 1990). Ob dies auch für das das 36 kDa-große, C-terminale Spaltprodukt des MSP10 zutrifft, welches ebenfalls das doppelte EGF-Motiv enthält und ebenfalls einen GPI-Anker trägt, ist jedoch nicht geklärt. Folglich bleibt viel Raum für Spekulationen zur Wirkungsweise MSP10-spezifischer, inhibitorischer Antikörper. Im Folgenden soll daher nur auf die Möglichkeit der Hemmung der Invasion *per se* eingegangen werden.

IV.10.1.2. Redundanz und Präferenzen der Interaktionen während der Invasion

Die Invasion roter Blutkörperchen durch Merozoiten ist ein mehrstufiger Prozess, der durch drei Hauptphasen charakterisiert ist: die Präinvasions-, die Invasions- und die Echinozytosephase (DVORAK *et al.*, 1975; GILSON und CRABB, 2009). Die Präinvasionsphase ist jene, in der der Merozoit an das rote Blutkörperchen bindet und sich reorientiert, sodass sein apikales Ende an der Erythrozytenmembran zu liegen kommt; danach ruht der Merozoit kurz bevor die eigentliche Invasionsphase beginnt (YAHATA *et al.*, 2012). Die Funktionen des MSP1₁₉ scheinen vornehmlich in der Präinvasionsphase angesiedelt.⁷¹

Mittlerweile sind mindestens elf verschiedene Paare an Interaktionspartnern zwischen Parasiten und roten Blutkörperchen beschrieben (vgl. Tabelle 25; DOLAN *et al.*, 1994; LOBO *et al.*, 2003; GILBERGER *et al.*, 2003; TRIGLIA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2012; DURAISINGH *et al.*, 2003; THAM *et al.*, 2010; 2011; KATO *et al.*, 2005; KARIUKI *et al.*, 2005; BARTHOLDSON *et al.*, 2012; 2013). Diese Interaktionen haben redundanten Charakter und schließen sich nicht gegenseitig aus, sodass auf alternative Invasionswege zurückgegriffen werden kann (MILLER *et al.*, 2002); schließlich unterscheiden sich die Wirte bspw. durch ihr anti-plasmodiales Antikörperrepertoire und durch An- oder Abwesenheit von Erythrozytenoberflächenmolekülen. Viele *P. falciparum*-Stämme haben darüber hinaus eine Präferenz für bestimmte Invasionsrouten und können diese unter Selektionsdruck ändern (DOLAN *et al.*, 1990; STUBBS *et al.*, 2005). Stämme HB3 und Dd2 könnten folglich deswegen schlechter inhibiert worden sein, weil sie bevorzugt Interaktionen/Interaktionspartner nutzen, die unabhängig von den EGF-Motiven des MSP10 sind.

IV.10.1.3. Inhibition und Affinität

Interessant ist die Beobachtung, dass humAb10.1, welcher die schwächste Affinität aufweist (Tabelle 15), die stärkste Inhibition aller MSP10-spezifischen humAbs zeigte. Dies erscheint kontraintuitiv, da Antikörper:Antigen-Interaktionen reversibel sind und dem Massenwirkungsgesetz unterliegen. Je höher die Affinität (K_D), desto geringer die Antikörperkonzentration, die nötig ist, um die Zielstruktur komplexiert zu halten und zu neutralisieren. Merozoiten lagern sich sehr schnell an ein neues, zu infizierendes rotes Blutkörperchen an (14-214 sec nach Aufplatzen des Schizonten) und können die Invasion innerhalb von 1-3 min vollendet haben (YAHATA *et al.*, 2012). Daher scheint vor allem eine hohe Assoziationsrate (k_a) sehr wichtig für die Invasionsinhibition.

Neben der Affinität hat jedoch die Spezifität maßgeblich Einfluss auf die Effektivität eines Antikörpers. HumAb10.1 und 10.2 tragen dieselbe schwere Kette, jedoch unterschiedliche leichte Ketten. Folglich wird sich der Teil ihrer Paratope, welcher durch die CDRs der leichten Ketten gebildet wird, etwas unterscheiden. Es ist also denkbar, dass sich das Epitop der humAb10.1 und humAb10.2 auf dem ersten EGF-Motiv des MSP10 ebenfalls unterscheidet. Ein solcher Unterschied könnte die mit humAb10.1 beobachtete, stärkere Inhibition erklären, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

IV.10.1.4. Inhibition und physiologische Antikörperkonzentration

Generell lässt sich festhalten, dass eine Konzentration von 10 mg/mL sehr weit von der physiologischen IgG-Konzentration entfernt ist, die ein einzelner Antikörper im Serum eines Menschen haben wird. Die totale Konzentration polyklonalen IgGs im Serum semi-immuner Spender liegt bei 20 mg/mL (HODDER *et al.*, 2001); jeder Mensch besitzt ein Repertoire von $1-2 \times 10^{11}$ B Zellentitäten mit unterschiedlicher Spezifität (GEORGIU *et al.*, 2014). MSP10-spezifische Antikörper können daher *in vivo* zumindest durch bloße Neutralisation vermutlich nur einen geringen Beitrag zur Abwehr gegen plasmodiale Blutstadien leisten. Diese Annahme wird außerdem durch die Vakzinstudie von GIRALDO *et al.* (2009) unterstützt, in welcher Nachtaffen (*Aotus spec.*) mit rekombinatem *P. vivax* MSP10 immunisiert wurden. Zwar zeigten die Äffchen eine starke, spezifische, antikörperbasierte Antwort, jedoch hatte die Impfung nach der Infektion mit *P. vivax* keinerlei Auswirkungen auf die Entwicklung der Parasitämie (GIRALDO *et al.*, 2009).

IV.10.2. Inhibition durch humAbAMA1

Das Inhibitionspotential des humAbAMA1 wurde mit sechs verschiedenen *P. falciparum*-Stämmen untersucht, die unterschiedlichen geographischen Ursprungs sind und sich in der Aminosäuresequenz des AMA1 unterscheiden (vgl. Abbildung 30; GUINET *et al.*, 1996; DREW *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu den generierten MSP10-spezifischen humAbs inhibierte humAbAMA1 alle getesteten Stämme, und zwar mit EC₅₀-Werten zwischen 35 µg/mL (233 nM) und 3,8 mg/mL (25 µM) (Abbildung 28, Tabelle 18). Mit 35 µg/mL liegt der EC₅₀-Wert des humAbAMA1 im unteren Bereich im Vergleich zu mAb1F9 (ca. 850 µg/mL) (COLEY *et al.*, 2006), AMA1-spezifischem, polyklonalem Kaninchen-IgG (34-180 µg/mL) (MIURA *et al.*, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2012; BOES *et al.*, 2014) und AMA1-spezifischem, polyklonalem humanem IgG (70-240 µg/mL) (MIURA *et al.*, 2009).⁷² Der vorliegende humAbAMA1 scheint folglich ein IgG des semi-immunen Antikörperreperiores zu sein, der zumindest in Bezug auf die Inhibition des Stamms 3D7 effizienter ist als der Großteil der polyklonalen AMA1-spezifischen IgG semi-immuner Spender.

IV.10.2.1. Inhibition, Wirkungsspektrum und Affinität

Die Beobachtung, dass humAbAMA1 alle getesteten rekombinanten AMA1-Varianten (DiCo 1-3, FCR-3, 3D7, HB3) erkannte (Abbildung 24) und die *P. falciparum*-Stämme 3D7, K1, FCR-3, HB3, Dd2 und W2mef inhibierte (Tabelle 18), deuten auf ein breites Wirkungsspektrum hin. Zwar sind einander entsprechende K_D- und EC₅₀-Werte nicht für jeden Stamm und dessen AMA1-Variante vorhanden, es zeichnet sich jedoch bei 3D7 und HB3 ab, dass eine höhere Affinität tatsächlich mit einer effizienteren Inhibition korreliert. Die Affinität für AMA1 3D7 lag bei $1,88 \times 10^{-10}$ M, der entsprechende EC₅₀-Wert bei 35 µg/mL; die Bindungsstärke bei AMA1 HB3 betrug $3,27 \times 10^{-8}$ M und der EC₅₀-Wert 190 µg/mL. Im Vergleich dazu liegt die Affinität des mAb1F9 für AMA1 3D7 bei $1,3 \times 10^{-9}$ M (BOES *et al.*, 2014); der entsprechende EC₅₀-Wert liegt bei 850 µg/mL (COLEY *et al.*, 2006). Mab1F9 ist

jedoch nicht direkt mit humAbAMA1 zu vergleichen, da sich deren Epitope etwas unterscheiden.

Die Stämme W2mef und Dd2, welche sehr nah miteinander verwandt sind (GUINET *et al.*, 1996), wurden erst bei einer Konzentration von ca. 3,8 mg/mL humAbAMA1 halbmaximal inhibiert (Tabelle 18). Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass sich AMA1 W2mef an drei Positionen (a, b, c) besonders stark von den Allelen der Stämme 3D7, HB3, K1 und FCR-3 unterscheidet (Abbildung 30, grüne Dreiecke). Diese drei Positionen gehören zu den fünf hochpolymorphen Resten des AMA1 (vgl. BAI *et al.*, 2005; DUAN *et al.*, 2008; Abbildung 30, violette Dreiecke). Es liegen zwar keine Werte zur Affinität des humAbAMA1 für AMA1 W2mef/Dd2 vor. Es ist jedoch klar, dass humAbAMA1 die Antigene AMA1 DiCo 1 und DiCo 3 erkannte (Abbildung 24), welche an zwei der drei Positionen (a und b) dieselben Aminosäurereste tragen wie AMA1 W2mef/Dd2 (Abbildung 30). An Position (c) besitzt AMA1 Wmef/Dd2 jedoch eine hydrophobe Seitenkette (L) statt einer geladenen (D oder H) wie AMA1 DiCo 1-3, FCR-3/FVO, K1, 3D7 und HB3. Die Vermutung, dass dieser Rest besonders kritisch für die AMA1:humAbAMA1-Interaktion ist, könnte mithilfe von SPR-Messungen mit rekombinantem AMA1 W2mef/Dd2 und der Strukturaufklärung des humAbAMA1(Fab):AMA1-Komplexes validiert werden.

Dennoch ist der Umstand vielversprechend, dass humAbAMA1 alle AMA1 DiCo Varianten erkannte, welche die große Variabilität aller bekannten AMA1-Allele abdecken sollen und als erfolgversprechende Impfstoffkandidaten gehandelt werden (vgl. REMARQUE *et al.*, 2008a; FABER *et al.*, 2013). Dies gibt Grund zur Annahme, dass humAbAMA1 weitere als jene im Rahmen dieser Arbeit getesteten sechs Stämme inhibiert. Dies wäre durch weitere Wachstumsinhibitionstests mit anderen etablierten Stämmen und neuen *P. falciparum*-Isolaten zu adressieren.

Da AMA1 außerdem nicht nur von Merozoiten, sondern auch von Sporozoiten exprimiert wird (SILVIE *et al.*, 2004) und *P. falciparum* kein paralogenes AMA1 oder RON2 besitzt (POUKCHANSKI *et al.*, 2013),⁷³ besteht Grund zur Annahme, dass humAbAMA1 auch Sporozoiten hemmt. Auch dies kann mit entsprechenden Sporozoiteninvasionstests überprüft werden (vgl. z.B. CHAPPEL *et al.*, 2004; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2010).

IV.10.2.2. Inhibition und physiologische Antikörperkonzentration

Im Fall der MSP10-spezifischen humAbs wurde deutlich, dass deren EC₅₀-Werte vermutlich zu hoch sind als dass sie einen relevanten Beitrag zum protektiven Antikörperrepertoire der semi-immunen Spender leisten können (Abschnitt IV.10.1.4.). Die EC₅₀-Werte von 35 - 265 µg/mL des humAbAMA1 scheinen hingegen eher in einem realistischen, physiologisch relevanten Konzentrationsbereich zu liegen, da der Gehalt AMA1-spezifischer IgG im Serum semi-immuner Individuen bei ca. 100 µg/mL liegt (HODDER *et al.*, 2001).

IV.10.2.3. Wirkprinzip des humAbAMA1

AMA1 ist ein essentielles Protein (TRIGLIA *et al.*, 2000; HEALER *et al.*, 2005) und sein Gen unterliegt diversifizierenden und ausgleichenden Selektionsdrücken, um dem

Immunsystem des Wirts auszuweichen und gleichzeitig funktionellen Anforderungen gerecht zu werden (POLLEY und CONWAY, 2001; CORTÉS *et al.*, 2003; POLLEY *et al.*, 2003). AMA1 besitzt sowohl mehrere dimorphe als auch fünf polymorphe Aminosäurepositionen (vgl. Abbildung 30; violette Dreiecke), von denen vier an einem Ende der hydrophoben Tasche liegen (BAI *et al.*, 2005).⁷⁴

Aufgrund der Variabilität der AMA1-Allele ist die Inhibition durch AMA1-reaktive Antikörper i.d.R. sehr stammspezifisch (KENNEDY *et al.*, 2002; HEALER *et al.*, 2002; BAI *et al.*, 2005; CORTÉS *et al.*, 2005). Dies trifft auch auf mAb1F9 zu, welcher *P. falciparum* 3D7 und D10 hemmt, nicht jedoch W2mef oder HB3 (COLEY *et al.*, 2006). Dies liegt an hochpolymorphen Resten (Reste 197 und 200 in Abbildung 30) im Epitop des mAb1F9 (COLEY *et al.*, 2006; 2007). Trotz der Tatsache, dass humAbAMA1 und mAb1F9 um die Bindung an AMA1 konkurrieren (Abbildung 25), vermag humAbAMA1 mehr als nur zwei Stämme zu inhibieren. Wie bereits in Abschnitt IV.9.3. vermutet, muss das Epitop des humAbAMA1 entweder größer sein oder mehr konservierte Seitenketten umfassen als das Epitop des mAb1F9.

Die Tatsachen, dass (1) humAbAMA1 und mAb1F9 um die Bindung an AMA1 konkurrieren (Abbildung 25), dass (2) mAb1F9 die Interaktion von AMA1 und RON2 unterbindet (COLEY *et al.*, 2006; 2007) und (3) dass humAbAMA1 nicht mehr an AMA1 zu binden vermag, wenn RON2sp1 bereits an AMA1 gebunden hat (Abbildung 26), legen nahe, dass humAbAMA1 die Merozoiteninvasion in ähnlicher Weise blockiert wie mAb1F9.

Es stellt sich die Frage, ob das Paratop des humAbAMA1 Ähnlichkeiten mit jenem des mAb1F9, mit RON2 und/ oder gar dem Peptid R1 besitzt. Peptid R1, welches per Phagendisplay generiert wurde, bindet ebenfalls in der hydrophoben Bindungstasche des AMA1, hemmt Plasmodien und besitzt eine gewisse Ähnlichkeit mit dem natürlichen Liganden RON2 (HARRIS *et al.*, 2005; VULLIEZ-LE NORMAND *et al.*, 2012). Ob das Paratop des humAbAMA1 augenscheinlich Gemeinsamkeiten mit mAb1F9, RON2 oder R1 hat, soll im Folgenden beleuchtet werden.

Auf den ersten Blick scheinen die CDRs des humAbAMA1 und des mAb1F9 nichts gemein zu haben. Jene Aminosäureseitenketten des mAb1F9, die mit AMA1 in Kontakt treten, sind E₁V₂ (FRH1), D₃₁ (CDRH1), G₂₆F₂₇K₂₈ (CDRH2), S₉₉H₁₀₀F₁₀₁ (CDRH3), Y₄₉Y₅₀Y₅₅T₅₆ (CDRκ1) und R₉₆ (CDRκ3) (COLEY *et al.*, 2007; vgl. Abbildung 30).

Bezüglich der Peptide RON2sp1 und R1 ist an der Interaktion mit AMA1 bei beiden Liganden ein Argininrest (R₂₀₄₁ bei RON2) maßgeblich beteiligt, dessen Guanidylrest sich perfekt in eine Tasche des AMA1 fügt; wird dieser Rest mutiert, bindet RON2 nicht mehr an AMA1 (VULLIEZ-LE NORMAND *et al.*, 2012). In dieser Bindungstasche wechselwirken fünf Reste mit insgesamt sieben Wasserstoffbrücken mit dem Guanidylrest des RON2 (Abbildung 30, Pfeile; VULLIEZ-LE NORMAND *et al.*, 2012, Abbildung 2(D)). Diese Tasche liegt zudem an jenem Ende der hydrophoben Bindungsfurche des AMA1, welches von polymorphen Aminosäurepositionen umringt ist und an welchem mAb1F9 und vermutlich auch humAbAMA1 binden.

Neben einem Argininrest enthalten RON2sp1 und R1 außerdem vornehmlich hydrophobe Reste (F, L, V, M) und Reste mit Hydroxy(m)ethylseitenketten (S, T). Bei der

Analyse der CDRs und der hochmutierten dritten Gerüstregion (FRH3) des humAbAMA1 zeigt sich, dass die FRH3 tatsächlich drei Argininreste (a, b, c) trägt, von denen zwei (b, c) durch Affinitätsreifung *in vivo* eingeführt wurden (Abbildung 14, Pfeile). Darüber hinaus sind die Argininreste (a) und (c) umgeben von hydrophoben Resten (F, L) und solchen, die Hydroxy(m)ethylseitenketten enthalten (S, T): Arginin (a): LKSRLTL und Arginin (b): FSLRLSS) (vgl. Abbildung 14). Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass humAbAMA1 den natürlichen Liganden, RON2, imitiert. Dies wäre analog zur Imitation des HIV-1-spezifischen bnAb VRC01, der gp120 erkennt und dessen Ligand, CD4, nachahmt (MASCOLA und HAYNES, 2013). Dies wird sich jedoch wiederum nur durch Strukturauflklärung des humAbAMA1(Fab):AMA1-Komplexes eindeutig klären lassen.

IV.10.3. Synergismusuntersuchungen

Die natürliche Situation *in vivo* ist jene, dass sich das Immunglobulinrepertoire gegen unterschiedlichste plasmodiale Antigene richtet und die Summe und Qualität der anti-plasmodialen Antikörper darüber entscheidet, ob das Antikörperspektrum protektiv ist (vgl. CHUANGCHAIYA und PERSSON, 2013).⁷⁵

Vor diesem Hintergrund interessierte es, ob diejenigen Antikörper, die *P. falciparum* am stärksten zu inhibieren vermochten, humAb10.1 und humAbAMA1, einen synergistischen Effekt entfalten können. Es zeigte sich mit einem Wert von $S = 1,5625$ in der Tat eine leichte synergistische Tendenz (Abbildung 29). Im Vergleich zu Synergismen (1) anderer Antikörperkombinationen, wie jenen von murinen PfRh4- und PfRh5-spezifischen IgG (WILLIAMS *et al.*, 2012), oder (2) anti-plasmodialer Chemotherapeutika (vgl. KERSCHBAUMER *et al.*, 2010, Abbildung 3; WURTZ *et al.*, 2010, Abbildung 2) ist dieser Effekt jedoch recht gering.

Gemäß WILLIAMS *et al.* (2012) gibt es mindestens zwei Möglichkeiten einen synergistischen inhibitorischen Effekt zu erzielen. Entweder die Antikörper erfüllen ihre Funktion nacheinander („in series“) oder gleichzeitig („in parallel“). Aufgrund der Annahme, dass MSP10 eher in der Präinvasionsphase beteiligt sein wird und AMA1 als Schlüsselprotein des eigentlichen Invasionsprozesses, d.h. als Rezeptor des RON2 und als Verankerungspunkt des Aktin-Myosin-Motors, fungiert (BAI *et al.*, 2005; PIZARRO *et al.*, 2005; TONKIN *et al.*, 2011; BAUM *et al.*, 2006; JEWETT und SIBLEY, 2003; SRINIVASAN *et al.*, 2011), liegt die Vermutung nahe, dass humAb10.1 und humAbAMA1 ihre Wirkung nacheinander entfalten.

V. Ausblick

V.1. MSP10-spezifische humAbs

Über die Funktion des Merozoitenoberflächenproteins 10 (MSP10), seine proteolytische Prozessierung und seine Interaktionspartner – auf Seiten des Parasiten und des Wirts – ist noch sehr wenig bekannt. Die generierten MSP10-spezifischen humAbs eignen sich für die Klärung dieser Forschungsfragen. So können z.B. mittels Immunopräzipitation Interaktionspartner identifiziert werden.

V.2. HumAbAMA1

Im Fall des humAbAMA1 ist die Strukturaufklärung seiner Fab-Region und von humAbAMA1(Fab):AMA1-Komplexen sehr wichtig. Somit kann direkt geklärt werden, ob dieser Antikörper, wie vermutet, in der hydrophoben Bindungsfurche des AMA1 bindet und welchen Beitrag die stark mutierte Gerüstregion (FRH3) (vgl. Abschnitte IV.5. und IV.10.2.3.) zur Inhibition leistet. Vor dem Hintergrund, dass die beiden AMA1-spezifischen inhibitorischen Antikörper mAb1F9 und mAb4G2 RON2 aus AMA1:RON2-Komplexen verdrängen können (SRINIVASAN *et al.*, 2011), stellt sich die Frage, ob humAbAMA1 ebenfalls dazu fähig ist. Dies kann mit SPR-Messungen und/ oder wie bei SRINIVASAN *et al.* (2011) mittels ELISA untersucht werden.

V.3. Weitere Funktionalitätstests

Vor dem Hintergrund, dass AMA1 nicht nur bei der Invasion von Merozoiten in Erythrozyten, sondern auch bei der Invasion von Sporozoiten in Hepatozyten eine Funktion zu haben scheint (SILVIE *et al.*, 2004), erscheinen Sporozoiteninvasionstests mit humAbAMA1 sinnvoll (vgl. z.B. CHAPPEL *et al.*, 2004; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2010).

Ganz allgemein vermögen Antikörper ihre protektive Wirkung *in vivo* auf verschiedene Weisen zu entfalten. Hierzu zählen (1) die bloße Neutralisierung, (2) die Opsonisierung und dadurch bedingte Beseitigung z.B. durch Aktivierung der Komplementkaskade und (3) die Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems, z.B. von Monozyten/ Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Die Aussagekraft des in dieser Arbeit genutzten Wachstumsinhibitionstests beschränkt sich dabei auf die Primärfunktion der Antikörper, d.h. die Neutralisation durch bloße Bindung an die Zielstruktur. Gerade im Fall des MSP1₉, welchem vermutlich eine ähnliche Funktion zukommt wie den EGF-Motiven des MSP10 (vgl. Abschnitte I.2. und IV.10.1.1.), scheint es als sei die Antikörperbindung *per se* nicht ausreichend, um eine Inhibition herbeizuführen (PLEASS und HOLDER, 2005; MCINTOSH *et al.*, 2007). Dieser Aspekt könnte teilweise auch auf die MSP10-spezifischen humAbs zutreffen. Weitere Tests mit Monozyten oder neutrophilen Granulozyten als Effektorzellen können hier zum Einsatz kommen (vgl. THEISEN *et al.*, 1998; DRUILHE *et al.*, 2005; JOOS *et al.*, 2010; KAPELSKI *et al.*, 2014).

V.4. Aspekte des Einsatzes humaner anti-plasmodialer Antikörper als passive Vakzine

Bezüglich der Möglichkeit, anti-plasmodiale humAbs für einen passiven Immunschutz einzusetzen, gibt es mehrere kritische Gesichtspunkte. Drei dieser Aspekte sollen hier beleuchtet werden. Zwei betreffen die Wirksamkeit, einer bezieht sich auf mögliche Kreuzreaktivität der humAbs mit humanen Proteinen.

V.4.1. Wirksamkeit

AMA1 gehört zu jenen Proteinen, die während der Invasion prozessiert und von der Merozoitenoberfläche entfernt werden können (OLIVIERI *et al.*, 2011). Dies wird mit „shedding“ bezeichnet. Folglich bestünde die Möglichkeit, dass humAbAMA1 auch an lösliches AMA1 im Plasma bindet und damit *in vivo* eine höhere Antikörperkonzentration notwendig wäre, um die *in vitro* beobachtete Inhibition zu bewirken. Die proteolytische Entfernung von Merozoitenoberflächenmolekülen bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass die löslichen Spaltprodukte ins Plasma gelangen.⁷⁶ Inwiefern das „shedding“ des AMA1 tatsächlich die Wirksamkeit der humAbAMA1 herabsetzen kann, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.⁷⁷

Ein weiterer Aspekt der Wirksamkeit betrifft die Konkurrenz anti-plasmodialer Antikörper mit unspezifischen Antikörpern um die Bindung an Fc-Rezeptoren, welche die Sekundärfunktionen – wie Phagozytose und ADCI – von Antikörpern bewirken. Es ist bekannt, dass *P. falciparum* eine Hypergammaglobulinämie induziert, bei der große Mengen unspezifischen IgGs gebildet werden. Dies wird als Verschleierungstaktik des Parasiten verstanden, da diese unspezifischen IgG mit anti-plasmodialen IgG um die Bindung an Fc-Rezeptoren konkurrieren und folglich deren Effektivität herabsetzen können (MILLER *et al.*, 1994; PLEASS und HOLDER, 2005). Folglich wäre *in vivo* wiederum eine höhere Konzentration anti-plasmodialer Antikörper nötig als *in vitro*. Dieser Aspekt wird primär für solche Antikörper ausschlaggebend sein, die nicht durch das bloße Erkennen ihres Epitops inhibierend wirken. Für die MSP10-spezifischen humAbs könnte dies kritisch sein. Für humAbAMA1 jedoch, welcher die Invasion ohne Zusatz von Effektorzellen effizient unterbindet, scheint dieser Punkt von geringerer Bedeutung.

V.4.2. Kreuzreaktivität

Sowohl bei MSP10- als auch bei AMA1-spezifischen Antikörpern stellt sich die Frage, ob diese nicht auch humane Proteine erkennen und damit autoreaktiv wirken könnten. Dies kann nur mit entsprechenden Tests mit humanen Gewebeschnitten, Seren, Proteinen und/ oder Zellen vollständig ausgeschlossen werden. Dennoch scheint die Gefahr der Kreuzreaktivität vergleichsweise gering vor dem Hintergrund, dass (1) es sich bei humAb10.2, humAb10.3 und humAbAMA1 um IgG handelt, welche aus gesunden Menschen stammen und authentische Paarungen zusammengehöriger schwerer und leichter Ketten besitzen, (2) die EGF-Motive des MSP10 nur eine sehr geringe Homologie zu humanen Proteinen aufweisen⁷⁸ und (3) kein humanes Protein existiert, welches funktionelle oder strukturelle Ähnlichkeit mit AMA1 zeigt (ALEXANDER *et al.*, 2006).

VI. Zusammenfassung

Malaria ist und bleibt eine der größten globalen gesundheitspolitisch relevanten Herausforderungen. Anfang des letzten Jahrhunderts zeigte sich bereits, dass passive Vakzinierungsstrategien mit polyklonalen Antikörpern semi-immuner Individuen vielversprechend sind. Bisher sind jedoch nur wenige humane monoklonale anti-plasmodiale Immunglobuline isoliert und charakterisiert worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, aus B Zellen semi-immuner ghanaischer Spender humane Volllängenantikörper zu generieren, welche eine Spezifität für *Plasmodium falciparum* besitzen und inhibitorisch wirken. Die Methode der Wahl umfasste (1) die EBV Transformation durchflusszytometrisch angereicherter reifer, antigenspezifischer B Lymphozyten, (2) die Sicherung der V_H -, V_K - und V_L -Sequenzen ihrer Immunglobuline und (3) deren Expression als IgG1: κ - oder IgG1: λ 2-Volllängenantikörper in *N. benthamiana*. Die Validierung und Charakterisierung der so generierten anti-plasmodialen Antikörper erfolgte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie und Wachstumsinhibitorstests *in vitro*. Neuartig an dieser Herangehensweise war es, ausschließlich die durchflusszytometrisch isolierten, antigenspezifischen B Zellen zu transformieren. Dies ist bisher noch nicht beschrieben worden und erlaubt eine ressourcenschonendere und effizientere EBV Transformation. Die vorliegende Arbeit kann folglich ebenfalls als Machbarkeitsstudie und Prozessoptimierung verstanden werden.

Es wurden vier humane monoklonale Antikörper (humAbs) des anti-plasmodialen Immunglobulinrepertoires semi-immuner Spender isoliert, kloniert und charakterisiert. Drei der humAbs erkannten das Merozoitenoberflächenprotein 10 (MSP10), einer das Apikale Membranantigen 1 (AMA1). Zuvor sind noch keine MSP10-reaktiven monoklonalen Antikörper isoliert worden. Monoklonale AMA1-spezifische Antikörper humanen Ursprungs sind bisher ebenfalls noch nicht in der Literatur beschrieben worden.

Jene drei Antikörper, die auf die authentische Paarung von schwerer und leichter Ketten zurückgingen, erwiesen sich als hochaffinitätsgereift (mindestens 39-59 Mutationen auf DNS-Ebene) und hochaffin für ihre jeweiligen Antigene ($K_D = 5,46 \times 10^{-9} \text{ M} - 1,99 \times 10^{-10} \text{ M}$). In Inhibitionstests zeigten die MSP10-spezifischen Antikörper *in vitro* eine stammabhängige Hemmung. Stamm 3D7 wurde mit EC_{50} -Werten zwischen 4,1 mg/mL und 9,5 mg/mL inhibiert. Bei den Stämmen HB3 und Dd2 wurde eine maximale Hemmung von ca. 39% bei 10 mg/mL IgG beobachtet. Im Gegensatz hierzu war der AMA1-reaktive humAb (humAbAMA1) panspezifisch und (hoch)inhibitorisch für alle getesteten *P. falciparum*-Stämme ($EC_{50} = 34,9 \mu\text{g/mL} - 3,8 \text{ mg/mL}$). Bezüglich der Funktionsweise des humAbAMA1 ist davon auszugehen, dass dieser – ähnlich wie mAb1F9 – in der hydrophoben Tasche des AMA1 bindet und so die Interaktion mit RON2 stört, welche für den Invasionsprozess essentiell ist.

Ein geeignetes Einsatzgebiet der drei generierten MSP10-spezifischen humAbs scheint vornehmlich in der Grundlagenforschung zu liegen. HumAbAMA1 scheint darüber hinaus ein geeigneter Kandidat für passive Immunisierungsstrategien zur Malariaphylaxe und -therapie.

Synopsis

Malaria tropica, caused by *Plasmodium falciparum* still poses a major challenge to global health care as well as to the economy in endemic countries. There is no efficient vaccine at hand, and multiple drug-resistant parasite strains are emerging. As yet, passive vaccination strategies with recombinant full-size human monoclonal antibodies (humAbs) are not pursued despite the fact that it has been shown early that these may confer passive immunity toward as well as effectively cure malaria infections by *P. falciparum*.

The major goal of the present thesis was thus to generate anti-plasmodial human monoclonal antibodies (humAbs) which are highly specific, possess a high affinity, and are capable of inhibiting *P. falciparum*. To this end antigen-specific IgG⁺ / CD22⁺ B cells from semi-immune Ghanaian donors were enriched by flow-cytometric cell sorting and were then subjected to EBV transformation. V_H⁻, V_κ⁻, and V_λ sequences of promising cultures were rescued and cloned into plant expression vectors. These V regions were then produced in the context of full-size IgG1:κ and IgG1:λ2 antibodies in *Nicotiana benthamiana*. Confocal immunofluorescence microscopy, surface plasmon resonance measurements and *in vitro* growth inhibition assays served to characterize the isolated humAbs.

The flow cytometric enrichment of antigen-specific B cells prior to their virocrine transformation can be considered a novelty. This approach allows for a more efficient EBV transformation requiring less personnel and material. From this point of view, the work presented can also be regarded as a feasibility study as well as a process optimization.

Four anti-plasmodial humAbs were isolated, cloned and characterized. Three of these humAbs recognized Merozoite Surface Protein 10 (MSP10). So far monoclonal anti-MSP10 antibodies have not been described yet. The fourth antibody was specific to Apical Membrane Antigen 1 (AMA1). To the best of our knowledge, this is the first human AMA1-specific antibody to be described.

Those three antibodies which possessed the genuine pairing of heavy and light chains were highly matured (at least 39-59 DNA mutations) and highly affine to their respective targets ($K_D = 5.46 \times 10^{-9} \text{ M} - 1.99 \times 10^{-10} \text{ M}$). In growth inhibition assays the MSP10-specific humAbs inhibited *P. falciparum* in a strain-dependent fashion. Strain 3D7 showed EC₅₀-values in the range of 4.1 mg/mL – 9.5 mg/mL. The maximal inhibition of strains HB3 and Dd2 was around 39% at 10 mg/mL IgG. In contrast, the AMA1-reactive humAb (humAbAMA1) was panspecific and (highly) inhibitory for all *P. falciparum* strains tested (EC₅₀ = 34.9 μg/mL – 3.8 mg/mL). Regarding the possible mode of action humAbAMA1 likely binds in the hydrophobic trough of AMA1 and thus torpedoes its interaction with RON2. It is generally accepted that the formation of the AMA1:RON2 complex is vital to the invasion of merozoites into new red blood cells.

Whereas the three MSP10-specific humAbs seem to be suitable primarily for basic research humAbAMA1 additionally appears to be an ideal candidate for passive immunization strategies for malaria prophylaxis and therapy.

VII. Bibliografie

A

ADAMS, G. P. and SCHIER, R. (1999): Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *Journal of Immunological Methods*, **231**(1-2): 249-60.

AGNANDJI, S. T., LELL, B., SOULANOUDJINGAR, S. S., FERNANDES, J. F., ABOSSOLO, B. P., CONZELMANN, C., METHOGO, B. G., DOUCKA, Y., FLAMEN, A., MORDMÜLLER, B., ISSIFOU, S., KREMSNER, P. G., SACARLAL, J., AIDE, P., LANASPA, M., APONTE, J. J., NHAMUAVE, A., QUELHAS, D., BASSAT, Q., MANDJATE, S., MACETE, E., ALONSO, P., ABDULLA, S., SALIM, N., JUMA, O., SHOMARI, M., SHUBIS, K., MACHERA, F., HAMAD, A. S., MINJA, R., MTORO, A., SYKES, A., AHMED, S., URASSA, A. M., ALI, A. M., MWANGOKA, G., TANNER, M., TINTO, H., D'ALESSANDRO, U., SORGHO, H., VALEA, I., TAHITA, M. C., KABORÉ, W., OUÉDRAOGO, S., SANDRINE, Y., GUIGUEMDÉ, R. T., OUÉDRAOGO, J. B., HAMEL, M. J., KARIUKI, S., ODERO, C., ONEKO, M., OTIENO, K., AWINO, N., OMOTO, J., WILLIAMSON, J., MUTURI-KIOI, V., LASERSON, K. F., SLUTSKER, L., OTIENO, W., OTIENO, L., NEKOYE, O., GONDI, S., OTIENO, A., OGUTU, B., WASUNA, R., OWIRA, V., JONES, D., ONYANGO, A. A., NJUGUNA, P., CHILENGI, R., AKOO, P., KERUBO, C., GITAKA, J., MAINGI, C., LANG, T., OLOTU, A., TSOFA, B., BEJON, P., PESHU, N., MARSH, K., OWUSU-AGYEI, S., ASANTE, K. P., OSEI-KWAKYE, K., BOAHEN, O., AYAMBA, S., KAYAN, K., OWUSU-OFORI, R., DOSOO, D., ASANTE, I., ADJEI, G., ADJEI, G., CHANDRAMOHAN, D., GREENWOOD, B., LUSINGU, J., GESASE, S., MALABEJA, A., ABDUL, O., KILAVO, H., MAHENDE, C., LIHELUKA, E., LEMNGE, M., THEANDER, T., DRAKELEY, C., ANSONG, D., AGBENYEGA, T., ADJEI, S., BOATENG, H. O., RETTIG, T., BAWA, J., SYLVERKEN, J., SAMBIAN, D., AGYEKUM, A., OWUSU, L., MARTINSON, F., HOFFMAN, I., MVALO, T., KAMTHUNZI, P., NKOMO, R., MSIKA, A., JUMBE, A., CHOME, N., NYAKUIPA, D., CHINTEDZA, J., BALLOU, W. R., BRULS, M., COHEN, J., GUERRA, Y., JONGERT, E., LAPIERRE, D., LEACH, A., LIEVENS, M., OFORI-ANYINAM, O., VEKEMANS, J., CARTER, T., LÉBOULLEUX, D., LOUCQ, C., RADFORD, A., SAVARESE, B., SCHELLENBERG, D., SILLMAN, M., VANSADIA, P. and RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP (2011): First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England Journal of Medicine*, **365**(20): 1863-1875.

AGUIRRE, A. J. and ROBERTSON, E. S. (2000): Epstein-Barr virus recombinants from BC-1 and BC-2 can immortalize human primary B lymphocytes with different levels of efficiency and in the absence of coinfection by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology*, **74**(2): 735-743.

AIKAWA, M., MILLER, L. H., JOHNSON, J. and RABBEGE, J. (1978): Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *The Journal of Cell Biology*, **77**(1): 72-82.

AIKAWA, M., MILLER, L. H., RABBEGE, J. and EPSTEIN, N. (1981): Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. *The Journal of Cell Biology*, **91**(1): 55-62.

ALAM, A., BHATNAGAR, R. K., RELAN, U., MUKHERJEE, P. and CHAUHAN, V. S. (2013): Proteolytic activity of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 3 on parasite profilin, a multifunctional protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **191**(2): 58-62.

ALEXANDER, D. L., ARASTU-KAPUR, S., DUBREMETZ, J. F. and BOOTHROYD, J. C. (2006): *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell*, **5**(7): 1169-1173.

AMOLI, M. M., CARTHY, D., PLATT, H. and OLLIER, W. E. R. (2009): EBV immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood. *International Journal of Epidemiology*, **37**: i41-i45.

ANDERS, R. F., CREWETHER, P. E., EDWARDS, S., MARGETTS, M., MATTHEW, M. L., POLLOCK, B. and PYE, D. (1998): Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine*, **16**(2-3): 240-247.

ASOU, H., TASHIRO, S., HAMAMOTO, K., OTSUJI, A., KITA, K. and KAMADA, N. (1991): Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood*, **77**(9): 2031-2036.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R.F., MOORE, D. D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J. A. and STRUHL, K. (1994): Current protocols in molecular biology. *New York, John Wiley & Sons, Inc.*

AVILA-CARIÑO, J., LEWIN, N., TOMITA, Y., SZELES, A., SANDLUND, A., MOSOLITS, S., MELLSTEDT, H., KLEIN, G. and KLEIN, E. (1997): B-CLL cells with unusual properties. *International Journal of Cancer*, **70**: 1-8.

B

BAI, T., BECKER, M., GUPTA, A., STRIKE, P., MURPHY, V. J., ANDERS, R. F. and BATCHELOR, A. H. (2005): Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102**(36): 12736-12741.

BAIRD, J. K. (1995): Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, **11**(3): 105-111.

BARFOD, L., BERNASCONI, N. L., DAHLBÄCK, M., JAROSSAY, D., ANDERSON, P. H., SALANTI, A., OFORI, M. F., TURNER, L., RESENDE, M., NIELSEN, M. A., THEANDER, T. G., SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A. and HVIID, L. (2007): Human pregnancy-associated malaria-specific B cells target polymorphic, conformational epitopes in VAR2CSA. *Molecular Microbiology*, **63**(2): 335-347.

BARTHOLDSON, S. J., BUSTAMANTE, L. Y., CROSNIER, C., JOHNSON, S., LEA, S., RAYNER, J. C. and WRIGHT, G. J. (2012): Semaphorin-7A is an erythrocyte receptor for *P. falciparum* merozoite-specific TRAP homolog, MTRAP. *Public Library of Science. Pathogens*, **8**(11): e1003031.

BARTHOLDSON, S. J., CROSNIER, C., BUSTAMANTE, L. Y., RAYNER, J. C. and WRIGHT, G. J. (2013): Identifying novel *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion receptors using systematic extracellular protein interaction screens. *Cellular Microbiology*, **15**(8): 1304-1312.

BASS, H., WALTERS, R. and DARKE, C. (2004): Provision of Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines in a routine tissue typing laboratory: practicalities and applications. *European Journal of Immunogenetics*, **31**: 87-92.

BATISTA, F. D. and NEUBERGER, M. S. (1998): Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity*, **8**(6): 751-759.

BATISTA, R., DE JESUS SILVA, A. Jr. and DE OLIVEIRA, A. B. (2009): Plant-Derived Antimalarial Agents: New Leads and Efficient Phytochemicals. Part II. Non-Alkaloidal Natural Products. *Molecules*, **14**(8): 3037-3072.

BAUER, M., HEEG, K., WAGNER, H. and LIPFORD, G. B. (1999): DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology*, **97**(4): 699-705.

BAUM, J., RICHARD, D., HEALER, J., RUG, M., KRNAJSKI, Z., GILBERGER, T. W., GREEN, J. L., HOLDER, A. A. and COWMAN, A. F. (2006): A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(8): 5197-5208.

BEN-BASSAT, H., GOLDBLUM, N., MITRANI, S., GOLDBLUM, T., YOFFEY, J. M., COHEN, M. M., BENTWICH, Z., RAMOT, B., KLEIN, E. and KLEIN, G. (1977): Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *International Journal of Cancer*, **19**(1): 27-33.

BERGMANN-LEITNER, E. S., DUNCAN, E. H., MULLEN, G. E., BURGE, J. R., KHAN, F., LONG, C. A., ANGOV, E. and LYON, J. A. (2006): Critical evaluation of different methods for measuring the functional activity of antibodies against malaria blood stage antigens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**(3): 437-442.

BERNASCONI, N. L., TRAGGIAI, E. and LANZAVECCHIA, A. (2002): Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, **298**(5601): 2199-2202.

BESTEIRO, S., MICHELIN, A., PONCHET, J., DUBREMETZ, J. F. and LEBRUN, M. (2009): Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *Public Library of Science. Pathology*, **5**(2): e1000309.

BHASIN, V. K. and TRAGER, W. (1984): Gametocyte-forming and non-gametocyte-forming clones of *Plasmodium falciparum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **33**(4): 534-537.

BLACK, C. G., WANG, L., WU, T. and COPPEL, R. L. (2003): Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *P. falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **127**(1): 59-68.

BLACK, C. G., WU, T., WANG, L., HIBBS, A. R. and COPPEL, R. L. (2001): Merozoite surface protein 8 of *Plasmodium falciparum* contains two epidermal growth factor-like domains. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **114**(2): 217-226.

BLACKMAN, M. J., HEIDRICH, H. G., DONACHIE, S., MCBRIDE, J. S. and HOLDER, A. A. (1990): A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, **172**(1): 379-382.

BOES, A., SPIEGEL, H., EDGUE, G., KAPELSKI, S., SCHEUERMAYER, M., FENDEL, R., REMARQUE, E., ALTMANN, F., MARESCH, D., REIMANN, A., PRADEL, G., SCHILLBERG, S. and FISCHER, R. (2014): Detailed functional characterization of glycosylated and nonglycosylated variants of malaria vaccine candidate PfAMA1 produced in *Nicotiana benthamiana* and analysis of growth inhibitory responses in rabbits. *Plant Biotechnology Journal*, doi: 10.1111/pbi.12255. [Epub ahead of print]

BONSIGNORI, M., HWANG, K. K., CHEN, X., TSAO, C. Y., MORRIS, L., GRAY, E., MARSHALL, D. J., CRUMP, J. A., KAPIGA, S. H., SAM, N. E., SINANGIL, F., PANCERA, M., YONGPING, Y., ZHANG, B., ZHU, J., KWONG, P. D., O'DELL, S., MASCOLA, J. R., WU, L., NABEL, G. J., PHOGAT, S., SEAMAN, M. S., WHITESIDES, J. F., MOODY, M. A., KELSOE, G., YANG, X., SODROSKI, J., SHAW, G. M., MONTEFIORI, D. C., KEPLER, T. B., TOMARAS, G. D., ALAM, S. M., LIAO, H. X. and HAYNES, B. F. (2011): Analysis of a clonal lineage of HIV-1 envelope V2/V3 conformational epitope-specific broadly neutralizing antibodies and their inferred unmutated common ancestors. *Journal of Virology*, **85**(19): 9998-10009.

BOTH, L., VAN DOLLEWEERD, C., WRIGHT, E., BANYARD, A. C., BULMER-THOMAS, B., SELDEN, D., ALTMANN, F., FOOKS, A. R. and MA, J. K. (2013): Production, characterization, and antigen specificity of recombinant 62-71-3, a candidate monoclonal antibody for rabies prophylaxis in humans. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **27**(5): 2055-2065.

BOUHAROUN-TAYOUN, H., OEUVRAY, C., LUNEL, F. and DRUILHE, P. (1995): Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *The Journal of Experimental Medicine*, **182**(2): 409-418.

BOYLE, M. J., WILSON, D. W. and BEESON, J. G. (2013a): New approaches to studying *Plasmodium falciparum* merozoite invasion and insights into invasion biology. *International Journal for Parasitology*, **43**(1): 1-10.

BOZDECH, Z., LLINÁS, M., PULLINAM, B.L., WONG, E. D., ZHU, J. and RERISI, J. L. (2003): The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *Public Library of Science. Biology*, **1**(1): E5.

BRANDTS, C. H., NDJAVÉ, M., GRANINGER, W. and KREMSNER, P. G. (1997): Effect of paracetamol on parasite clearance time in *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, **350**(9079): 704-709.

BROCHET, X., LEFRANC, M.-P. and GIUDICELLI, V. (2008): IMGTV-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, **36**: W503-W508.

BUCHACHER, A., PREDL, R., STRUTZENBERGER, K., STEINFELLNER, W., TRKOLA, A., PURTSCHER, M., GRUBER, G., TAUER, C., STEINDL, F., JUNGBAUER, A. and KATINGER, H. (1994): Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **10**(4): 359-369.

C

CALARESE, D. A., SCANLAN, C. N., ZWICK, M. B., DEECHONGKIT, S., MIMURA, Y., KUNERT, R., ZHU, P., WORMALD, M. R., STANFIELD, R. L., ROUX, K. H., KELLY, J. W., RUDD, P. M., DWEK, R. A., KATINGER, H., BURTON, D. R. and WILSON, I. A. (2003): Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science*, **300**(5628): 2065-2071.

CHAPPEL, J. A., HOLLINGDALE, M. R. and KANG, A. S. (2004): IgG(4) Pf NPNA-1 a human anti-*Plasmodium falciparum* sporozoite monoclonal antibody cloned from a protected individual inhibits parasite invasion of hepatocytes. *Human Antibodies*, **13**(3): 91-96.

- CHATTOPADHYAY, R., VELMURUGAN, S., CHAKIATH, C., ANDREWS DONKOR, L., MILHOUS, W., BARNWELL, J. W., COLLINS, W. E. and HOFFMAN S. L. (2010): Establishment of an *in vitro* assay for assessing the effects of drugs on the liver stages of *Plasmodium vivax* malaria. *Public Library of Science. One*, **5**(12): e14275.
- CHELIMO, K., OFULLA, A. V., NARUM, D. L., KAZURA, J. W., LANAR, D. E. and JOHN, C. C. (2005): Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens vary by age and antigen in children in a malaria-holoendemic area of Kenya. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **24**(8): 680-684.
- CHEN, B., VOGAN, E. M., GONG, H., SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. and HARRISON, S. C. (2005): Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature*, **433**(7028): 834-841.
- CHENG, X. J., HAYASAKA, H., WATANABE, K., TAO, Y. L., LIU, J. Y., TSUKAMOTO, H., HORII, T., TABABE, K. and TACHIBANA, H. (2007): Production of high-affinity human monoclonal antibody fab fragments to the 19-kilodalton C-terminal merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, **75**(7): 3614-3620.
- CHILD, M. A., EPP, C., BUJARD, H. and BLACKMAN, M. J. (2010): Regulated maturation of malaria merozoite surface protein-1 is essential for parasite growth. *Molecular Microbiology*, **78**(1): 187-202.
- CHU, R. S., MCCOOL, T., GREENSPAN, N. S., SCHREIBER, J. R. and HARDING, C. V. (2000): CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants for pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines and enhance antipolysaccharide immunoglobulin G2a (IgG2a) and IgG3 antibodies. *Infection and Immunity*, **68**(3): 1450-1456.
- CHUANGCHAIYA, S. and PERSSON, K. E. (2013): How should antibodies against *P. falciparum* merozoite antigens be measured? *Journal of Tropical Medicine*, **2013**: 493834.
- CLARK, I. A. (1978): Does endotoxin cause both the disease and parasite death in acute malaria and babesiosis? *Lancet*, **2**(8080): 75-77.
- CLYDE, D. F. (1975): Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **24**(3): 397-401.
- COHEN, S., MCGREGOR, I. A. and CARRINGTON, S. (1961): Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, **192**: 733-737.
- COLEY, A. M., GUPTA, A., MURPHY, V. J., BAI, T., KIM, H., FOLEY, M., ANDERS, R. F. and BATCHELOR, A. H. (2007): Structure of the malaria antigen AMA1 in complex with a growth-inhibitory antibody. *Public Library of Science. Pathology*, **3**(9): 1308-1319.
- COLEY, A. M., PARISI, K., MASCIANTONIO, R., HOECK, J., CASEY, J. L., MURPHY, V. J., HARRIS, K. S., BATCHELOR, A. H., ANDERS, R. F. and FOLEY, M. (2006): The most polymorphic residue on *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 determines binding of an invasion-inhibitory antibody. *Infection and Immunity*, **74**(5): 2628-2636.
- COLLINS, C. R., WITHERS-MARTINEZ, C., BENTLEY, G. A., BATCHELOR, A. H., THOMAS, A. W. and BLACKMAN, M. J. (2007): Fine mapping of an epitope recognized by an invasion-inhibitory monoclonal antibody on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**(10): 7431-7441.
- COLLINS, C. R., WITHERS-MARTINEZ, C., HACKETT, F. and BLACKMAN M. J. (2009): An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *Public Library of Science. Pathology*, **5**(1): e1000273.
- CORONELLA, J. A., TELLEMAN, P., TRUONG, T. D., YLERA, F. and JUNGHANS, R. P. (2000): Amplification of IgG VH and VL (Fab) from single human plasma cells and B cells. *Nucleic Acids Research*, **28**(20): E85.
- CORTÉS, A., MELLOMBO, M., MASCIANTONIO, R., MURPHY, V. J., REEDER, J. C. and ANDERS, R. F. (2005): Allele specificity of naturally acquired antibody responses against *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infection and Immunity*, **73**(1): 422-430.
- CORTÉS, A., MELLOMBO, M., MUELLER, I., BENET, A., REEDER, J. C. and ANDERS, R. F. (2003): Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA1. *Infection and Immunity*, **71**(3): 1416-1426.

CORTI, D., BIANCHI, S., VANZETTA, F., MINOLA, A., PEREZ, L., AGATIC, G., GUARINO, B., SILACCI, B., MARCANDALLI, J., MARSLAND, B. J., PIRALLA, A., PERCIVALLE, E., SALLUSTO, F., BALDANTI, F. and LANZAVECCHIA, A. (2013): Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature*, **501**(7467): 439-443.

CORTI, D., SUGUITAN, A. L. Jr., PINNA, D., SILACCI, C., FERNANDEZ-RODRIGUEZ, B. M., VANZETTA, F., SANTOS, F., LUKE, C. J., TORRES-VELEZ, F. J., TEMPERTON, N. J., WEISS, R. A., SALLUSTO, F., SUBBARAO, K. and LANZAVECCHIA, A. (2010a): Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *The Journal of Clinical Investigation*, **120**(5): 1663-1673.

COUNTER, C. M., BOTELHO, F. M., WANG, P., HARLEY, C. B. and BACCHETTI, S. (1994): Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *Journal of Virology*, **68**(5): 3410-3414.

COX, F. (2002): History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**(4): 595-612.

COX-SINGH, J., DAVIS, T. M., LEE, K. S., SHAMSUL, S. S., MATUSOP, A., RATNAM, S., RAHMAN, H. A., CONWAY, D. J. and SINGH, B. (2008): *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Diseases*, **46**(2): 165-171.

CREWETHER, P. E., MATTHEW, M. L., FLEGG, R. H. and ANDERS, R. F. (1996): Protective Immune Responses to Apical Membrane Antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* Involve Recognition of Strain-Specific Epitopes. *Infection and Immunity*, **64**(8): 3310-3317.

CRICHTON, R. R. and CHARLOTEAUX-WAUTERS, M. (1987): Iron transport and storage. *European Journal of Biochemistry*, **164**(3): 485-506.

CROMPTON, P. D., TRAORE, B., KAYENTAO, K., DOUMBO, S., ONGOIBA, A., DIAKITE, S. A., KRAUSE, M. A., DOUMTABE, D., KONE, Y., WEISS, G., HUANG, C. Y., DOUMBIA, S., GUINDO, A., FAIRHURST, R. M., MILLER, L. H., PIERCE, S. K. and DOUMBO, O. K. (2008): Sick cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, **198**(9): 1265-1275.

D

DAVIS, B. J. (1964): DISC electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **121**: 404-427.

DAY, K. P. and MARSH, K. (1991): Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Immunology Today*, **12**(3): A68-A71.

DEANS, J. A., ALDERSON, T., THOMAS, A. W., MITCHELL, G. H., LENNOX, E. S. and COHEN, S. (1982): Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical and Experimental Immunology*, **49**(2): 297-309.

DEZENGOTITA, V. M., ABSTON, L. R., SCHMELZER, A. E., SHAW, S. and MILLER, W. M. (2002): Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality. *Biotechnology and Bioengineering*, **78**(7): 741-752.

DI ZENZO, G., DI LULLO, G., CORTI, D., CALABRESI, V., SINISTRO, A., VANZETTA, F., DIDONA, B., CIANCHINI, G., HERTL, M., EMING, R., AMAGAI, M., OHYAMA, B., HASHIMOTO, T., SLOOSTRA, F., SALLUSTO, F., ZAMBRUNO, G. and LANZAVECCHIA, A. (2012): Pemphigus autoantibodies generated through somatic mutations target the desmoglein-3 cis-interface. *The Journal of Clinical Investigation*, **122**(10): 3781-3790.

DIRMEIER, U., NEUHIERL, B., KILGER, E., REISBACH, G., SANDBERG, M. L. and HAMMERSCHMIDT, W. (2003): Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Research*, **63**(11): 2982-2989.

DISKIN, R., SCHEID, J. F., MARCOVECCHIO, P. M., WEST, A. P. Jr., KLEIN, F., GAO, H., GNANAPRAGASAM, P. N., ABADIR, A., SEAMAN, M. S., NUSSENZWEIG, M. C. and BJORKMAN, P. J. (2011): Increasing the potency and breadth of an HIV antibody by using structure-based rational design. *Science*, **334**(6060): 1289-1293.

- DOLAN, S. A., MILLER, L. H. and WELLEMS, T. E. (1990): Evidence for a switching mechanism in the invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Clinical Investigation*, **86**(2): 618-624.
- DOLAN, S. A., PROCTOR, J. L., ALLING, D. W., OKUBO, Y., WELLEMS, T. E. and MILLER, L. H. (1994): Glycophorin B as an EBA-175 independent *Plasmodium falciparum* receptor of human erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **64**(1): 55-63.
- DONAHUE, C. G., CARRUTHERS, V. B., GILK, S. D. and WARD, G. E. (2000): The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **111**(1): 15-30.
- DONDORP, A. M., NOSTEN, F., Yi, P., DAS, D., PHYO, A. P., TARNING, J., LWIN, K. M., ARIEY, F., HANPITHAKPONG, W., LEE, S. J., RINGWALD, P., SILAMUT, K., IMWONG, M., CHOTIVANICH, K., LIM, P., HERDMAN, T., AN, S. S., YEUNG, S., SINGHASIVANON, P., DAY, N. P., LINDEGARDH, N., SOCHEAT, D. and WHITE, N. J. (2009): Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*, **361**(5): 455-467.
- DONG, W., ROY, A. K. and LI, Y. (1999): Rapid identification of cloned HIV-1 fragments. *Methods in Molecular Medicine*, **17**: 83-87.
- DOOLAN, D. L. (2011): *Plasmodium* immunomics. *International Journal for Parasitology*, **41**(1): 3-20.
- DOOLAN, D. L. and MARTINEZ-ALIER, N. (2006): Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Current Molecular Medicine*, **6**(2): 169-185.
- DORIA-ROSE, N. A., SCHRAMM, C. A., GORMAN, J., MOORE, P. L., BHIMAN, J. N., DEKOSKY, B. J., ERNANDES, M. J., GEORGIEV, I. S., KIM, H. J., PANCERA, M., STAUPE, R. P., ALTAE-TRAN, H. R., BAILER, R. T., CROOKS, E. T., CUPO, A., DRUZ, A., GARRETT, N. J., HOI, K. H., KONG, R., LOUDER, M. K., LONGO, N. S., MCKEE, K., NONYANE, M., O'DELL, S., ROARK, R. S., RUDICELL, R. S., SCHMIDT, S. D., SHEWARD, D. J., SOTO, C., WIBMER, C. K., YANG, Y., ZHANG, Z., NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM, MULLIKIN, J. C., BINLEY, J. M., SANDERS, R. W., WILSON, I. A., MOORE, J. P., WARD, A. B., GEORGIU, G., WILLIAMSON, C., ABDOOL KARIM, S. S., MORRIS, L., KWONG, P. D., SHAPIRO, L., MASCOLA, J. R., BECKER, J., BENJAMIN, B., BLAKESLEY, R., BOUFFARD, G., BROOKS, S., COLEMAN, H., DEKHTYAR, M., GREGORY, M., GUAN, X., GUPTA, J., HAN, J., HARGROVE, A., HO, S. L., JOHNSON, T., LEGASPI, R., LOVETT, S., MADURO, Q., MASIELLO, C., MASKERI, B., MCDOWELL, J., MONTEMAYOR, C., MULLIKIN, J., PARK, M., RIEBOW, N., SCHANDLER, K., SCHMIDT, B., SISON, C., STANTRIPPO, M., THOMAS, J., THOMAS, P., VEMULAPALLI, M. and YOUNG A. (2014): Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies. *Nature*, **509**(7498): 55-62.
- DOUGLAS, A. D., WILLIAMS, A. R., KNUEPFER, E., ILLINGWORTH, J. J., FURZE, J. M., CROSNIER, C., CHOUDHARY, P., BUSTAMANTE, L. Y., ZAKUTANSKY, S. E., AWUAH, D. K., ALANINE, D. G., THERON, M., WORTH, A., SHIMKETS, R. RAYNER, J. C., HOLDER, A. A., WRIGHT, G. J. and DRAPER, S. J. (2014): Neutralization of *Plasmodium falciparum* merozoites by antibodies against PfrH5. *Journal of Immunology*, **192**(1): 245-258.
- DREW, D. R., HODDER, A. N., WILSON, D. W., FOLEY, M., MUELLER, I., SIBA, P. M., DENT, A. E., COWMAN, A. F. and BEESON, J. G. (2012): Defining the antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the requirements for a multi-allele vaccine against malaria. *Public Library of Science. One*, **7**(12): e51023.
- DREW, D. R., O'DONNELL, R. A., SMITH, B. J. and CRABB, B. S. (2004): A common cross-species function for the double epidermal growth factor-like modules of the highly divergent plasmodium surface proteins MSP-1 and MSP-8. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**(19): 20147-20153.
- DREW, D. R., SANDERS, P. R. and CRABB, B. S. (2005): *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 8 is a ring-stage membrane protein that localizes to the parasitophorous vacuole of infected erythrocytes. *Infection and Immunity*, **73**(7): 3912-3922.
- DRUILHE, P., SPERTINI, F., SOESOE, D., CORRADIN, G., MEJIA, P., SINGH, S., AUDRAN, R., BOUZIDI, A., OEUVRAY, C. and ROUSSILHON, C. (2005): A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *Public Library of Science. Medicine*, **2**(11): e344.

DUAN, J., MU, J., THERA, M. A., JOY, D., KOSAKOVSKY POND, S. L., DIEMERT, D., LONG, C., ZHOU, H., MIURA, K., OUATTARA, A., DOLO, A., DOUMBO, O., SU, X. Z. and MILLER, L. (2008): Population structure of the genes encoding the polymorphic *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1: implications for vaccine design. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **105**(22): 7857-7862.

DURASINGH, M. T., TRIGLIA, T., RALPH, S. A., RAYNER, J. C., BARNWELL, J. W., MCFADDEN, G. I. and COWMAN, A. F. (2003): Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *The European Molecular Biology Organization Journal*, **22**(5): 1047-1057.

DUTTA, S., HAYNES, J. D., BARBOSA, A., WARE, L. A., SNAVELY, J. D., MOCH, J. K., THOMAS, A. W. and LANAR, D. E. (2005): Mode of action of invasion-inhibitory antibodies directed against apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, **73**(4): 2116-2122.

DUTTA, S., HAYNES, J. D., MOCH, J. K., BARBOSA, A. and LANAR, D. E. (2003): Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **100**(21): 12295-12300.

DVORAK, J. A., MILLER, L. H., WHITEHOUSE, W. C. and SHIROISHI, T. (1975): Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*, **187**(4178): 748-750.

DZIKOWSKI, R. and DEITSCH, R. W. (2009): Genetics of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Current Genetics*, **55**(2): 103-110.

E

EDOZIEN, J. C., GILLES, H. M. and UDEOZO, I. O. K. (1962): Adult and cord-blood gamma-globulin and immunity to malaria in Nigerians. *Lancet*, **280**(7263): 951-955.

EGAN, A. F., CHAPPEL, J. A., BURGHAUS, P. A., MORRIS, J. S., MCBRIDE, J. S., HOLDER, A. A., KASLOW, D. C. and RILEY, E. M. (1995): Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP1(19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, **63**(2): 456-466.

ELLIOTT, S. R. and BEESON, J. G. (2008): Estimating the burden of global mortality in children aged <5 years by pathogen-specific causes. *Clinical Infectious Diseases*, **46**(11): 1794-1795.

ENGBERG, J., ANDERSEN, P. S., NIELSEN, L. K., DZIEGIEL, M., JOHANSEN, L. K. and ALBRECHTSEN, B. (1995): Phage-display libraries of murine and human antibody Fab fragments. *Methods in Molecular Biology*, **51**: 355-376.

ENGLISH, D. and ANDERSEN, B. R. (1974): Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Journal of Immunological Methods*, **5**(3): 249-252.

F

FABER, B. W., YOUNIS, S., REMARQUE, E. J., RODRIGUEZ GARCIA, R., RIASAT, V., WALRAVEN, V., VAN DER WERFF, N., VAN DER EIJK, M., CAVANAGH, D. R., HOLDER, A. A., THOMAS, A. W. and KOCKEN, C. H. (2013): Diversity covering AMA1-MSP119 fusion proteins as malaria vaccines. *Infection and Immunity*, **81**(5): 1479-1490.

FAZEKAS DE ST GROTH, S., WEBSTER, R. G. and DATYNER, A. (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta*, **71**: 377-391.

FEIGE, M. J., GROSCURTH, S., MARCINOWSKI, M., SHIMIZU, Y., KESSLER, H., HENDERSHOT, L. M. and BUCHNER, J. (2009): An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Molecular Cell*, **34**(5): 569-579.

FEIGE, M. J., HENDERSHOT, L. M. and BUCHNER, J. (2010): How antibodies fold. *Trends in Biochemical Sciences*, **35**(4): 189-198.

FELLER, T., THOM, P., KOCH, N., SPIEGEL, H., ADDAI-MENSAH, O., FISCHER, R., REIMANN, A., PRADEL, G., FENDEL, R., SCHILLBERG, S., SCHEUERMAYER, M. and SCHINKEL, H. (2013): Plant-

based production of recombinant Plasmodium surface protein pf38 and evaluation of its potential as a vaccine candidate. *Public Library of Science. One*, **8**(11): e79920.

FOOTE, J. and MILSTEIN, C. (1991): Kinetic maturation of an immune response. *Nature*, **352**(6335): 530-532.

FOWLER, E. V., PETERS, J. M., GATTON, M. L., CHEN, N. and CHENG, Q. (2002): Genetic diversity of the DBLalpha region in *Plasmodium falciparum* var genes among Asia-Pacific isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **120**(1): 117-126.

FRAUSSEN, J., VROLIX, K., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, P., LOSEN, M., MEULEMANS, E., DE BAETS, M. H., STINISSEN, P. and SOMERS, V. (2010): A novel method for making human monoclonal antibodies. *Journal of Autoimmunity*, **35**(2): 130-134.

FRESHNEY, R. I. (2005): Culture of animal cells: A manual of basic technique. *Wiley, New York*.

FREVERT, U., USYNIN, I., BAER, K. AND KLOTZ, C. (2006): SPOROZOITES TO THE LIVER? Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cellular Microbiology*, **8**(10): 1537-1546.

G

GARDNER, M. J., HALL, N., FUNG, E., WHITE, O., BERRIMAN, M., HYMAN, R. W., CARLTON, J. M., PAIN, A., NELSON, K. E., BOWMAN, S., PAULSEN, I. T., JAMES, K., EISEN, J. A., RUTHERFORD, K., SALZBERG, S. L., CRAIG, A., KYES, S., CHAN, M. S., NENE, V., SHALLOM, S. J., SUH, B., PETERSON, J., ANGIUOLI, S., PERTEA, M., ALLEN, J., SELENGUT, J., HAFT, D., MATHER, M. W., VAIDYA, A. B., MARTIN, D. M., FAIRLAMB, A. H., FRAUNHOLZ, M. J., ROOS, D. S., RALPH, S. A., MCFADDEN, G. I., CUMMINGS, L. M., SUBRAMANIAN, G. M., MUNGALL, C., VENTER, J. C., CARUCCI, D. J., HOFFMAN, S. L., NEWBOLD, C., DAVIS, R. W., FRASER, C. M. and BARRELL, B. (2002): Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419**(6906): 498-511.

GAUR, D., STORRY, J. R., REID, M. E., BARNWELL, J. W. and MILLER, L. H. (2003): *Plasmodium falciparum* is able to invade erythrocytes through a trypsin-resistant pathway independent of Glycophorin B. *Infection and Immunity*, **71**(12): 6742-6746.

GEORGIU, G., IPPOLITO, G. C., BEAUSANG, J., BUSSE, C. E., WARDEMANN, H. and QUAKE, S. R. (2014): The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nature Biotechnology*, **32**(2): 158-168.

GILBERGER, T.-W., THOMPSON, J. K., TRIGLIA, T., GOOD, R. T., DURASINGH, M. T. and COWMAN, A. F. (2003): A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(16): 14480-14486.

GILSON, P. R. and CRABB, B. S. (2009): Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *International Journal for Parasitology*, **39**(1): 91-96.

GILSON, P. R., NEBL, T., VUKCEVIC, D., MORITZ, R. L., SARGEANT, T., SPEED, T. P., SCHOFIELD, L. and CRABB, B. S. (2006): Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Proteomics*, **5**(7): 1286-1299.

GIRALDO, M. A., AREVALO-PINZON, G., ROJAS-CARABALLO, J., MONGUI, A., RODRIGUEZ, R. and PATARROYO, M. A. (2009): Vaccination with recombinant *Plasmodium vivax* MSP-10 formulated in different adjuvants induces strong immunogenicity but no protection. *Vaccine*, **28**(1): 7-13.

GIRITCH, A., MARILLONNET, S., ENGLER, C., VAN ELDIK, G., BOTTERMAN, J., KLIMYUK, V. and GLEBA, Y. (2006): Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**(40): 14701-14706.

GOEL, K. G., LI, X., CHEN, H., LIU, S.-C., CHISHTI, A. H. and OH, S. S. (2003): Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(9): 5164-5169.

GOMORD, V. and FAYE, L. (2004): Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**(2): 171-181.

- GORDON, J., LEY, S. C., MELAMED, M. D., AMAN, P. and HUGHES-JONES, N. C. (1984): Soluble factor requirements for the autostimulatory growth of B lymphoblasts immortalized by Epstein-Barr virus. *The Journal of Experimental Medicine*, **159**(5): 1554-1559.
- GRAM, G. J., HEMMING, A., BOLMSTEDT, A., JANSSON, B., OLOFSSON, S., AKERBLUM, L., NIELSEN, J. O. and HANSEN, J. E. (1994): Identification of an N-linked glycan in the V1-loop of HIV-1 gp120 influencing neutralization by anti-V3 antibodies and soluble CD4. *Archives of Virology*, **139**(3-4): 253-261.
- GRAVES, P. and GELBAND, H. (2006a): Vaccines for preventing malaria (blood-stage). *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* CD006199.
- GRAVES, P. and GELBAND, H. (2006b): Vaccines for preventing malaria (pre-erythrocytic). *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* CD006198.
- GRAVES, P. and GELBAND, H. (2006c): Vaccines for preventing malaria (SPf66). *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* CD005966.
- GRECO, W. R., BRAVO, G. and PARSONS, J. C. (1995): The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews*, **47**(2): 331-385.
- GREENWOOD, B. M., FIDOCK, D. A., KYLE, D. E., KAPPE, S. H., ALONSO, P. L., COLLINS, F. H. and DUFFY, P. E. (2008): Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**(4): 1266-1276.
- GROUX, H. and GYSIN, J. (1990): Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Research in Immunology*, **141**(6): 529-542.
- GUINET, F., DVORAK, J. A., FUJIOKA, H., KEISTER, D. B., MURATOVA, O., KASLOW, D. C., AIKAWA, M., VAIDYA, A. B. and WELLEMS, T. E. (1996): A developmental defect in *Plasmodium falciparum* male gametogenesis. *The Journal of Cell Biology*, **135**(1): 269-278.
- GUPTA, S., SNOW, R. W., DONNELLY, C. A., MARSH, K. and NEWBOLD, C. (1999): Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nature Medicine*, **5**(3): 340-343.
- ## H
- HALDER, S., MURAKAMI, M., VERMA, S. C., KUMAR, P., YI, F. and ROBERTSON, E. S. (2009): Early events associated with infection of Epstein-Barr virus infection of primary B-cells. *Public Library of Science. One*, **4**(9): e7214.
- HARRIS, K. S., CASEY, J. L., COLEY, A. M., MASCIANTONIO, R., SABO, J. K., KEIZER, D. W., LEE, E. F., MCMAHON, A., NORTON, R. S., ANDERS, R. F. and FOLEY, M. (2005): Binding hot spot for invasion inhibitory molecules on *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infection and Immunity*, **73**(10): 6981-6989.
- HEALER, J., CRAWFORD, S., RALPH, S., MCFADDEN, G. and COWMAN, A. F. (2002): Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infection and Immunity*, **70**(10): 5751-5758.
- HEALER, J., MURPHY, V., HODDER, A. N., MASCIANTONIO, R., GEMMILL, A. W., ANDERS, R. F., COWMAN, A. F. and BATCHELOR, A. (2004): Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, **52**(1): 159-168.
- HEALER, J., TRIGLIA, T., HODDER, A. N., GEMMILL, A. W. and COWMAN, A. F. (2005): Functional analysis of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 utilizing interspecies domains. *Infection and Immunity*, **73**(4): 2444-2451.
- HELENIUS, A. and AEBI, M. (2001): Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **291**(5512): 2364-2369.
- HIATT, A., CAFFERKEY, R. and BOWDISH, K. (1989): Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, **342**(6245): 76-78.

- HODDER, A. N., CREWETHER, P. E. and ANDERS, R. F. (2001): Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infection and Immunity*, **69**(5): 3286-3294.
- HODDER, A. N., CREWETHER, P. E., MATTHEW, M. L., REID, G. E., MORITZ, R. L., SIMPSON, R. J. and ANDERS, R. F. (1996): The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**(46): 29446-29452.
- HOFFMAN, S. L., BILLINGSLEY, P. F., JAMES, E., RICHMAN, A., LOYEVSKY, M., LI, T., CHAKRAVARTY, S., GUNASEKERA, A., CHATTOPADHYAY, R., LI, M., STAFFORD, R., AHUMADA, A., EPSTEIN, J. E., SEDEGAH, M., REYES, S., RICHIE, T. L., LYKE, K. E., EDELMAN, R., LAURENS, M. B., PLOWE, C. V. and SIM, B. K. (2010): Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Human Vaccines*, **6**(1): 97-106.
- HOFFMANN, S. L. and FRANKE, E. D. (1994): Inducing protective immune responses against the sporozoite and liver stages of Plasmodium. *Immunology Letters*, **41**(2-3): 89-94.
- HOLLEY, D. W., GROH, B. S., WOZNIAK, G., DONOHOE, D. R., SUN, W., GODFREY, V. and BULTMAN, S. J. (2013): The BRG1 chromatin remodeler regulates widespread changes in gene expression and cell proliferation during B cell activation. *Journal of Cellular Physiology*, **229**(1): 44-52.
- HOWELL, S. A., WITHERS-MARTINEZ, C., KOCKEN, C. H., THOMAS, A. W. and BLACKMAN, M. J. (2001): Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(33): 31311-31320.
- HUANG, J., OFEK, G., LAUB, L., LOUDER, M. K., DORIA-ROSE, N. A., LONGO, N. S., IMAMICHI, H., BAILER, R. T., CHAKRABARTI, B., SHARMA, S. K., ALAM, S. M., WANG, T., YANG, Y., ZHANG, B., MIGUELES, S. A., WYATT, R., HAYNES, B. F., KWONG, P. D., MASCOLA, J. R. and CONNORS, M. (2012): Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature*, **491**(7424): 406-412.
- HUANG, Z., PHOOLCHAROEN, W., LAI, H., PIENSOOK, K., CARDINEAU, G., ZEITLIN, L., WHALEY, K. J., ARNTZEN, C. J., MASON, H. S. and CHEN, Q. (2010): High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnology and Bioengineering*, **106**(1): 9-17.
- HUMME, S., REISBACH, G., FEEDERLE, R., DELECLUSE, H.-J., BOUSSE, K., HAMMERSCHMIDT, W. and SCHEPERS, A. (2003): The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, **100**(19): 10989-10994.
- HWANG, K. K., CHEN, X., KOZINK, D. M., GUSTILO, M., MARSHALL, D. J., WHITESIDES, J. F., LIAO, H. X., CATERA, R., CHU, C. C., YAN, X. J., LUFTIG, M. A., HAYNES, B. F. and CHIORAZZI, N. (2012): Enhanced outgrowth of EBV-transformed chronic lymphocytic leukemia B cells mediated by coculture with macrophage feeder cells. *Blood*, **119**(7): e35-e44.
- I**
- ICHIKAWA, A., KATAKURA, Y., TERUYA, K., HASHIZUME, S. and SHIRAHATA, S. (1999): *In vitro* immunization of human peripheral blood lymphocytes: establishment of B cell lines secreting IgM specific for cholera toxin B subunit from lymphocytes stimulated with IL-2 and IL-4. *Cytotechnology*, **31**: 131-139.
- J**
- JAFARSHAD, A., DZIEGIEL, M. H., LUNDQUIST, R., NIELSEN, L. K., SINGH, S. and DRUILHE, P. L. (2007): A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγR2 and FcγR3. *Journal of Immunology*, **178**(5): 3099-3106.
- JENSEN, J. B. and TRAGER, W. (1978): *Plasmodium falciparum* in culture: establishment of additional strains. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **27**(4): 743-746.
- JEWETT, T. J. and SIBLEY, L. D. (2003): Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Molecular Cell*, **11**(4): 885-894.
- JONES, E. A., GOODFELLOW, P. N., BODMER, J. G. and BODMER, W. F. (1975): Serological identification of HL-A-linked human "Ia-type" antigens. *Nature*, **256**: 651-652.

JOOS, C., MARRAMA, L., POLSON, H. E., CORRE, S., DIATTA, A. M., DIOUF, B., TRAPE, J. F., TALL, A., LONGACRE, S. and PERRAUT, R. (2010): Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies. *Public Library of Science. One*, **5**(3): e9871.

K

KAPELSKI, S., KLOCKENBRING, T., FISCHER, R., BARTH, S. and FENDEL, R. (2014): Assessment of the neutrophilic antibody-dependent respiratory burst (ADRB) response to *Plasmodium falciparum*. *Journal of Leukocyte Biology*, pii: jlb.4A0614-283RR. [Epub ahead of print]

KARIUKI, M. M., LI, X., YAMODO, I., CHISHTI, A. H. and OH, S. S. (2005): Two *Plasmodium falciparum* merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**(4): 1690-1695.

KARUNAWEERA, N. D., GRAU, G. E., GAMAGE, P., CARTER, R. and MENDIS, K. N. (1992): Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **89**(8): 3200-3203.

KATAOKA, H., TAHARA, H., WATANABE, T., SUGAWARA, M., IDE, T., GOTO, M., FURUICHI, Y., and SUGIMOTO, M. (1997): Immortalization of immunologically committed Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines accompanied by a strong telomerase activity. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, **62**(4): 203-211.

KATO, K., MAYER, D. C., SINGH, S., REID, M. and MILLER, L. H. (2005): Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102**(15): 5552-5557.

KEHOE, J. W., VELAPPAN, N., WALBOLT, M., RASMUSSEN, J., KING, D., LOU, J., KNOPP, K., PAVLIK, P., MARKS, J. D., BERTOZZI, C. R. and BRADBURY, A. R. (2006): Using phage display to select antibodies recognizing post-translational modifications independently of sequence context. *Molecular and Cellular Proteomics*, **5**(12): 2350-2363.

KENNEDY, M. C., WANG, J., ZHANG, Y., MILES, A. P., CHITSAZ, F., SAUL, A., LONG, C. A., MILLER, L. H. and STWOERS, A. W. (2002): In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infection and Immunity*, **70**(12): 6948-6960.

KERSCHBAUMER, G., WERNSDORFER, G., WIEDERMANN, U., CONGPUONG, K., SIRICHAISINTHOP, J. and WERNSDORFER, W. H. (2010): Synergism between mefloquine and artemisinin and its enhancement by retinol in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Wiener Klinische Wochenschrift*, **122 Suppl 3**:57-60.

KLEIN, F., DISKIN, R., SCHEID, J. F., GAEBLER, C., MOUQUET, H., GEORGIEV, I. S., PANCERA, M., ZHOU, T., INCESU, R. B., FU, B. Z., GNANAPRAGASAM, P. N., OLIVEIRA, T. Y., SEAMAN, M. S., KWONG, P. D., BJORKMAN, P. J. and NUSSENZWEIG, M. C. (2013): Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization. *Cell*, **153**(1): 126-138.

KOMORI, A., XU, Z., WU, X., ZAN, H. and CASALI, P. (2006): Biased dA/dT somatic hypermutation as regulated by the heavy chain intronic iE μ enhancer and 3'E α enhancers in human lymphoblastoid B cells. *Molecular Immunology*, **43**: 1817-1826.

KONCZ, C. and SCHELL, J. (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics*, **204**(3): 383-396.

KORSINCZKY, M., CHEN, N., KOTECKA, B., SAUL, A., RIECKMANN, K. and CHENG, Q. (2000): Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**(8): 2100-2108.

KUMARATILAKE, L. M., FERRANTE, A. and RZEPZYK, C. M. (1990): Tumor necrosis factor enhances neutrophil-mediated killing of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, **58**(3): 788-793.

KUMARATILAKE, L. M., FERRANTE, A., JAEGER, T. and RZEPczyk, C. (1996): GM-CSF-induced priming of human neutrophils for enhanced phagocytosis and killing of asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: synergistic effects of GM-CSF and TNF. *Parasite Immunology*, **18**(3): 115-123.

KWIATKOWSKI, D. (1989): Febrile temperatures can synchronize the growth of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *The Journal of Experimental Medicine*, **169**(1): 357-361.

KWIATKOWSKI, D., MOLYNEUX, M. E., STEPHENS, S., CURTIS, N., KLEIN, N., POINTAIRE, P., SMIT, M., ALLAN, R., BREWSTER, D. R., GRAU, G. E. and GREENWOOD, B. M. (1993): Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *The Quarterly Journal of Medicine*, **86**(2): 91-98.

KYHSE-ANDERSEN, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **10**(3-4): 203-209.

L

LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259): 680-685.

LAMARQUE, M., BESTEIRO, S., PAPOIN, J., ROQUES, M., VULLIEZ-LE NORMAND, B., MORLON-GUYOT, J., DUBREMETZ, J. F., FAUQUENOY, S., TOMAVO, S., FABER, B. W., KOCKEN, C. H., THOMAS, A. W., BOULANGER, M. J., BENTLEY, G. A. and LEBRUN, M. (2011): The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *Public Library of Science. Pathology*, **7**(2): e1001276.

LANGHORNE, J., NDUNGU, F. M., SPONAAS, A. M. and MARSH, K. (2008): Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*, **9**(7): 725-732.

LANTZ, O., ALARD, P., CHAVANEL, G., FRIES, D., SENIK, A. and CHARPENTIER, B. (1991): EBV cell-lines (LCL) and E- cells as stimulator cells for limiting dilution analysis (LDA) of alloreactive IL-2-secreting cells (IL-2-SC) and cytotoxic precursors (CTLp). Comparison of their stimulator capacity and ability to generate specific alloreactivity. *Journal of Immunological Methods*, **137**: 121-132.

LASKOV, R., YAHUDA, V., HAMOA, R. and STEINITZ, M. (2011): Preferential targeting of somatic hypermutation to hotspot motifs and hypermutable sites and generation of mutational clusters in the IgVH alleles of a rheumatoid factor producing lymphoblastoid cell line. *Molecular Immunology*, **48**: 733-745.

LAVERAN, C. L. A. (1881): Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme. Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. *J.-B. Baillière, Paris*.

LAVERAN, C. L. A. (1884): Traité des Fièvres Palustres. *Octave Doin, Paris*.

LAZAROU, M., GUEVARA PATIÑO, J. A., JENNINGS, R. M., MCINTOSH, R. S., SHI, J., HOWELL, S., CULLEN, E., JONES, T., ADAME-GALLEGOS, J. R., CHAPPEL, J. A., MCBRIDE, J. S., BLACKMAN, M. J., HOLDER, A. A. and PLEASS, R. J. (2009): Inhibition of erythrocyte invasion and *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies. *Infection and Immunity*, **77**(12): 5659-5667.

LEE, J. H., PARK, D. Y., LEE, K. J., KIM, Y. K., SO, Y. K., RYU, J. S., OH, S. H., HAN, Y. S., KO, K., CHOO, Y. K., PARK, S. J., BRODZIK, R., LEE, K. K., OH, D. B., HWANG, K. A., KOPROWSKI, H., LEE, Y. S. and KO, K. (2013): Intracellular reprogramming of expression, glycosylation, and function of a plant-derived antiviral therapeutic monoclonal antibody. *Public Library of Science. One*, **8**(8): e68772.

LEROUGE, P., CABANES-MACHETEAU, M., RAYON, C., FISCHETTE-LAINÉ, A. C., GOMORD, V. and FAYE, L. (1998): N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology*, **38**(1-2): 31-48.

LEWIN, N., AMAN, P., MASUCCI, M. G., KLEIN, E., KLEIN, G., OBERG, B., STRANDER, H., HENLE, W. and HENLE, G. (1987): Characterization of EBV-carrying B-cell populations in healthy seropositive individuals with regard to density, release of transforming virus and spontaneous outgrowth. *International Journal of Cancer*, **39**(4): 472-476.

LEYKAUF, K., TREECK, M., GILSON, P. R., NEBL, T., BRAULKE, T., COWMAN, A. F., GILBERGER, T. W. and CRABB, B. S. (2010): Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays

an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *Public Library of Science. Pathology*, **6**(6): e1000941.

LI, C., WANG, R., WU, Y., ZHANG, D., HE, Z. and PAN, W. (2010): Epitope mapping of PfCP-2.9, an asexual blood-stage vaccine candidate of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, **9**:94.

LI, X., CHEN, H., OO, T. H., DALY, T. M., BERGMAN, L. W., LIU, S.-C., CHISHTI, A. H. and OH, S. S. (2004): A co-ligand complex anchors *Plasmodium falciparum* merozoites to the erythrocyte invasion receptor Band 3. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**(7): 5765-5771.

LI, X., MARINKOVIC, M., RUSSO, C., MCKNIGHT, C. J., COETZER, T. L. and CHISHTI, A. H. (2012): Identification of a specific region of *Plasmodium falciparum* EBL-1 that binds to host receptor glycoporphin B and inhibits merozoite invasion in human red blood cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **183**(1): 23-31.

LIAO, H. X., LYNCH, R., ZHOU, T., GAO, F., ALAM, S. M., BOYD, S. D., FIRE, A. Z., ROSKIN, K. M., SCHRAMM, C. A., ZHANG, Z., ZHU, J., SHAPIRO, L., NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM, MULLIKIN, J. C., GNANAKARAN, S., HRABER, P., WIEHE, K., KELSOE, G., YANG, G., XIA, S. M., MONTEFIORI, D. C., PARKS, R., LLOYD, K. E., SCEARCE, R. M., SODERBERG, K. A., COHEN, M., KAMANGA, G., LOUDER, M. K., TRAN, L. M., CHEN, Y., CAI, F., CHEN, S., MOQUIN, S., DU, X., JOYCE, M. G., SRIVATSAN, S., ZHANG, B., ZHENG, A., SHAW, G. M., HAHN, B. H., KEPLER, T. B., KORBER, B. T., KWONG, P. D., MASCOLA, J. R. and HAYNES, B. F. (2013): Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature*, **496**(7446): 469-476.

LIN, J. J. (1995): Electrotransformation of agrobacterium. *Methods in Molecular Biology*, **47**: 171-178.

LINDESMITH, L. C., BELTRAMELLO, M., DONALDSON, E. F., CORTI, D., SWANSTROM, J., DEBBINK, K., LANZAVECCHIA, A. and BARIC, R. S. (2012): Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. *Public Library of Science. Pathogens*, **8**(5): e1002705.

LOBO, C.-A., RODRIGUEZ, M., REID, M. and LUSTIGMAN, S. (2003): Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). *Blood*, **101**(11): 4628-4631.

LOHI, H., KUJALA, M., MAKELA, S., LEHTONEN, E., KESTILA, M., SAARIALHO-KERE, U., MARKOVICH, D. and KERE, J. (2002): Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers SLC26A7, -A8, and -A9. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(16): 14246-14254.

LONG, H. Y., LELL, B., DIETZ, K. and KREMSNER, P. G. (2001): *Plasmodium falciparum*: *in vitro* growth inhibition by febrile temperatures. *Parasitology Research*, **87**(7): 553-555.

LUNDQUIST, R., NIELSEN, L. K., JAFARSHAD, A., SOESOE, D., CHRISTENSEN, L. H., DRUILHE, P. and DZIEGIEL, M. H. (2006): Human recombinant antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 cloned from peripheral blood leukocytes of individuals with immunity to malaria demonstrate antiparasitic properties. *Infection and Immunity*, **74**(6): 3222-3231.

LYON, J. A., HAYNES, J. D., DIGGS, C. L., CHULAY, J. D. and PRATT-ROSSITER, J. M. (1986): *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface by antibodies when schizonts mature in the presence of growth inhibitory immune serum. *Journal of Immunology*, **136**(6): 2252-2258.

M

MA, J. K., LEHNER, T., STABILA, P., FUX, C. I. and HIATT, A. (1994): Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. *European Journal of Immunology*, **24**(1): 131-138.

MACAGNO, A., BERNASCONI, N. L., VANZETTA, F., DANDER, E., SARASINI, A., REVELLO, M. G., GERNA, G., SALLUSTO, F. and LANZAVECCHIA, A. (2010): Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *Journal of Virology*, **84**(2): 1005-1013.

MARSH, K. and KINYANJUI, S. (2006): Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunology*, **28**(1-2): 51-60.

- MARSHALL, V. M., SILVA, A., FOLEY, M., CRANMER, S., WANG, L., MCCOLL, D. J., KEMP, D. J. and COPPEL, R. L. (1997): A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain. *Infection and Immunity*, **65**(11): 4460-4467.
- MARTIN, H. J., LEE, J. M., WALLS, D. and HAYWARD, S. D. (2007): Manipulation of the toll-like receptor 7 signaling pathway by Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, **81**(18): 9748-9758.
- MASCOLA, J. R. and HAYNES, B. F. (2013): HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunological Reviews*, **254**(1): 225-244.
- MATSUOKA, H., YOSHIDA, S., HIRAI, M. and ISHII, A. (2002): A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitology International*, **51**(1): 17-23.
- MCBRIDE, J. S. and HEIDRICH, H. G. (1987): Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **23**(1): 71-84.
- MCGREGOR, I. A., CARRINGTON, S. P. and COHEN, S. (1963): Treatment of East African *P. falciparum* malaria with West African human γ -globulin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **57**(3): 170-175.
- MCINTOSH, R. S., SHI, J., JENNINGS, R. M., CHAPPEL, J. C., DE KONING-WARD, T. F., SMITH, T., GREEN, J., VAN EGMOND, M., LEUSEN, J. H., LAZAROU, M., VAN DE WINKEL, J., JONES, T. S., CRABB, B. S., HOLDER, A. A. and PLEASS, R. J. (2007): The importance of human Fc γ RI in mediating protection to malaria. *Public Library of Science. Pathogens*, **3**(5): e72.
- MEDINA, J. F., MARTÍNEZ-ANSÓ, E., VAZQUEZ, J. J. and PRIETO, J. (1997): Decreased anion exchanger 2 immunoreactivity in the liver of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, **25**(1): 12-17.
- MENÉNDEZ, C., BARDAJÍ, A., SIGAUQUE, D., SANZ, S., APONTE, J. J., MABUNDA, S. and ALONSO, P. L. (2010): Malaria prevention with IPTp during pregnancy reduces neonatal mortality. *Public Library of Science. One*, **5**(2): e9438.
- MILLER, G. and LIPMAN, M. (1973): Release of infectious Epstein-Barr Virus by transformed marmoset leukocytes. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **70**(1): 190-194.
- MILLER, G., SHOPE, T., LISCO, H., STITT, D. and LIPAN, M. (1972): Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **69**(2): 383-387.
- MILLER, L. H., BARUCH, D. I., MARSH, K. and DOUMBO, O. K. (2002): The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **415**(6872): 673-679.
- MILLER, L. H., DAVID, P. H., HUDSON, D. E., HADLEY, T. J., RICHARDS, R. L. and AIKAWA, M. (1984): Monoclonal antibodies to a 140,000-m.w. protein on *Plasmodium knowlesi* merozoites inhibit their invasion of rhesus erythrocytes. *Journal of Immunology*, **132**(1): 438-442.
- MILLER, L. H., GOOD, M. F. and MILLON, G. (1994): Malaria pathogenesis. *Science*, **264**(5167): 1878-1883.
- MILLER, L. H., ROBERTS, T., SHAHABUDDIN, M. and MCCUTCHAN, T. F. (1993): Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Molecular and Biochemical Parasitology*, **59**(1): 1-14.
- MITCHELL, G. H., THOMAS, A. W., MARGOS, G., DLUZIEWSKI, A. and BANNISTER, L. H. (2004): Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infection and Immunity*, **72**(1): 154-158.
- MIURA, K., ZHOU, H., DIOUF, A., MORETZ, S. E., FAY, M. P., MILLER, L. H., MARTIN, L. B., PIERCE, M. A., ELLIS, R. D., MULLEN, G. E. and LONG, C. A. (2009): Anti-apical-membrane-antigen-1 antibody is more effective than anti-42-kilodalton-merozoite-surface-protein-1 antibody in inhibiting *plasmodium falciparum* growth, as determined by the *in vitro* growth inhibition assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, **16**(7): 963-968.

MOLYNEUX, M. E., TAYLOR, T. E., WIRIMA, J. J. and BORGSTEIN, A. (1989): Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria: A study of 131 comatose Malawian children. *The Quarterly Journal of Medicine*, **71**(265): 441-459.

MOORE, K. L. (2003): The Biology and Enzymology of Protein Tyrosine O-Sulfation. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 24243-24246.

MOORE, K. L. (2009): Protein tyrosine sulfation: a critical posttranslation modification in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **106**(35): 14741-14742.

MORGAN, W. D., LOCK, M. J., FRENKIEL, T. A., GRAINGER, M. and HOLDER, A. A. (2004): Malaria parasite-inhibitory antibody epitopes on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1(19) mapped by TROSY NMR. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **138**(1): 29-36.

MOSS, D. K., REMARQUE, E. J., FABER, B. W., CAVANAGH, D. R., ARNOT, D. E., THOMAS, A. W. and HOLDER, A. A. (2012): *Plasmodium falciparum* 19-kilodalton merozoite surface protein 1 (MSP1)-specific antibodies that interfere with parasite growth in vitro can inhibit MSP1 processing, merozoite invasion, and intracellular parasite development. *Infection and Immunity*, **80**(3): 1280-1287.

MOURA, R. A., WEINMANN, P., PEREIRA, P. A., CAETANO-LOPES, J., CANHÃO, H., SOUSA, E., MOURÃO, A. F., RODRIGUES, A. M., QUEIROZ, M. V., SOUTO-CARNEIRO, M. M., GRAÇA, L. and FONSECA, J. E. (2010): Alterations on peripheral blood B-cell subpopulations in very early arthritis patients. *Rheumatology*, **49**(6): 1082-1092.

N

NARUM, D. L. and THOMAS, A. W. (1994): Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **67**(1): 59-68.

NGOUNDU-LANDJI, J., NWUBA, R. I., ANUMUDU, C. I., ODAIBO, A. B., MATONDO MAYA, W. D., AWOBODE, H. O., OKAFOR, C. M., MORENIKEJI, O. A., ASINOBI, A., NWAGWU, M., HOLDER, A. A. and NTOUMI, F. (2010): Fine specificity of anti-MSP19 antibodies and multiplicity of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 types in individuals in Nigeria with sub-microscopic infection. *Malaria Journal*, **9**:287.

NILSANG, S., NANDAKUMAR, K. S., GALAEV, I. Y., RAKSHIT, S. K., HOLMDAHL, R., MATTIASSON, B. and KUMAR, A. (2007): Monoclonal antibody production using a new supermacroporous cryogel bioreactor. *Biotechnology Progress*, **23**(4): 932-939.

NOSTEN, F., TER KUILE, F., CHONGSUPHAJASIDDHI, T., LUXEMBURGER, C., WEBSTER, H. K., EDSTEIN, M., PHAIPUN, L., THEW, K. L. and WHITE, N. J. (1991): Mefloquine-resistant falciparum malaria on the Thai-Burmese border. *Lancet*, **337**(8750): 1140-1143.

NÜSSLER, A., DRAPIER, J. C., RÉNIA, L., PIED, S., MILTGEN, F., GENTILINI, M. and MAZIER, D. (1991): L-arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *European Journal of Immunology*, **21**(1): 227-230.

NUTTALL, J., VINE, N., HADLINGTON, J. L., DRAKE, P., FRIGERIO, L. and MA, J. K. (2002): ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants. *European Journal of Biochemistry*, **269**(24): 6042-6051.

O

OHLIN, M., KRISTENSSON, K., CARLSSON, R. and BORREBAECK, C. A. (1992): Epstein-Barr virus-induced transformation of human B lymphocytes: the effect of L-leucyl-L-leucine methyl ester on inhibitory T cell populations. *Immunology Letters*, **34**(3): 221-228.

OLIVIERI, A., COLLINS, C. R., HACKETT, F., WITHERS-MARTINEZ, C., MARSHALL, J., FLYNN, H. R., SKEHEL, J. M. and BLACKMAN, M. J. (2011): Juxtamembrane shedding of *Plasmodium falciparum* AMA1 is sequence independent and essential, and helps evade invasion-inhibitory antibodies. *Public Library of Science. Pathogens*, **7**(12): e1002448.

OSIER, F. H., FEGAN, G., POLLEY, S. D., MURUNGI, L., VERRA, F., TETTEH, K. K., LOWE, B., MWANGI, T., BULL, P. C., THOMAS, A. W., CAVANAGH, D. R., MCRRIDE, J. S., LANAR, D. E., MACKINNON, M. J., CONWAY, D. J. and MARSH, K. (2008): Breadth and magnitude of antibody responses

to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infection and Immunity*, **76**(5): 2240-2248.

P

PACHECO, M. A., ELANGO, A. P., RAHMAN, A. A., FISHER, D., COLLINS, W. E., BARNWELL, J. W. and ESCALANTE, A. A. (2012): Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 (MSP8) and 10 (MSP10) in *Plasmodium* spp. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**(5): 978-986.

PALMER, C., DIEHN, M., ALIZADEH, A. A. and BROWN, P. O. (2006): Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BioMed Central Genomics*, **7**: 115.

PEJCHAL, R., WALKER, L. M., STANFIELD, R. L., PHOGAT, S. K., KOFF, W. C., POIGNARD, P., BURTON, D. R. and WILSON, I. A. (2010): Structure and function of broadly reactive antibody PG16 reveal an H3 subdomain that mediates potent neutralization of HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **107**(25): 11483-11488.

PERSSON, K. E. (2010): Erythrocyte invasion and functionally inhibitory antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Tropica*, **114**(3): 138-143.

PERSSON, K. E., MCCALLUM, F. J., REILING, L., LISTER, N. A., STUBBS, A. F., COWMAN, A. F., MARSH, K. and BEESON, J. G. (2008): Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**(1): 342-351.

PETERSON, M. G., MARSHALL, V. M., SMYTHE, J. A., CREWETHER, P. E., LEW, A., SILVA, A., ANDERS, R. F. and KEMP, D. J. (1989): Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Biology*, **9**(7): 3151-3154.

PINNA, D., CORTI, D., JAROSSAY, D., SALLUSTO, F. and LANZAVECCHIA, A. (2009): Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *European Journal of Immunology*, **39**(5): 1260-1270.

PIZARRO, J. C., CHITARRA, V., VERGER, D., HOLM, I., PÊTRES, S., DARTEVELLE, S., NATO, F., LONGACRE, S. and BENTLEY, G. A. (2003): Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. *Journal of Molecular Biology*, **328**(5): 1091-1103.

PIZARRO, J. C., VULLIEZ-LE NORMAND, B., CHESNE-SECK, M. L., COLLINS, C. R., WITHERS-MARTINEZ, C., HACKETT, F., BLACKMAN, M. J., FABER, B. W., REMARQUE, E. J., KOCKEN, C. H., THOMAS, A. W. and BENTLEY, G. A. (2005): Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science*, **308**(5720): 408-411.

PLEASS, R. J. and HOLDER, A. A. (2005): Opinion: antibody-based therapies for malaria. *Nature Reviews. Microbiology*, **3**(11): 893-899.

POL, E., KARLSSON, R., ROOS, H., JANSSON, A., XU, B., LARSSON, A., JARHEDE, T., FRANKLIN, G., FUENTES, A. and PERSSON, S. (2007): Biosensor-based characterization of serum antibodies during development of an anti-IgE immunotherapeutic against allergy and asthma. *Journal of Molecular Recognition*, **20**(1): 22-31.

POLLEY, S. D. and CONWAY, D. J. (2001): Strong diversifying selection on domains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 gene. *Genetics*, **158**(4): 1505-1512.

POLLEY, S. D., CHOKEJINDACHAI, W. and CONWAY, D. J. (2003): Allele frequency-based analyses robustly map sequence sites under balancing selection in a malaria vaccine candidate antigen. *Genetics*, **165**(2): 555-561.

POLLEY, S. D., MWANGI, T., KOCKEN, C. H., THOMAS, A. W., DUTTA, S., LANAR, D. E., REMARQUE, E., ROSS, A., WILLIAMS, T. N., MWAMBINGU, G., LOWE, B., CONWAY, D. J. and MARSH, K. (2004): Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine*, **23**(5): 718-728.

POUKCHANSKI, A., FRITZ, H. M., TONKIN, M. L., TREECK, M., BOULANGER, M. J. and BOOTHROYD, J. C. (2013): *Toxoplasma gondii* sporozoites invade host cells using two novel paralogues of RON2 and AMA1. *Public Library of Science. One*, **8**(8): e70637.

PRITSCH, O., TROUSSARD, X., MAGNAC, C., MAURO, F. R., DAVI, F., PAYELLE-BROGARD, B., DUMAS, G., PULIK, M., CLERGET, F., MANDELLI, F., CHIORAZZI, N., SCHROEDER, H. W. Jr., LEPORRIER, M. and DIGHIRO, G. (1999): VH gene usage by family members affected with chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, **107**(3): 616-624.

PUNTES, A., OCAMPO, M., RODRÍGUEZ, L. E., VERA, R., VALBUENA, J., CURTIDOR, H., GARCÍA, J., LÓPEZ, R., TOVAR, D., CORTES, J., RIVERA, Z. and PATARROYO, M. E. (2005): Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-10 human erythrocyte specific binding regions. *Biochimie*, **87**(5): 461-472.

R

RADEMACHER, T., SACK, M., ARCALIS, E., STADLMANN, J., BALZER, S., ALTMANN, F., QUENDLER, H., STIEGLER, G., KUNERT, R., FISCHER, R. and STÖGER, E. (2008): Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans. *Plant Biotechnology Journal*, **6**(2): 189-201.

RADFAR, A., MÉNDEZ, D., MONERIZ, C., LINARES, M., MARÍN-GARCÍA, P., PUYET, A., DIEZ, A. and BAUTISTA, J. (2009): Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *Nature Protocols*, **4**(12): 1899-1915.

RAJEWSKY, K. (1996): Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, **381**(6585): 751-758.

RAMASAMY, R. and RAJAKARUNA, R. (1997): Association of malaria with inactivation of alpha1,3-galactosyl transferase in catarrhines. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1360**(3): 241-246.

RAMASAMY, R. (1998): Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in Malaria. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1406**(1): 10-27.

RAMASAMY, R., JONES, G. and LORD, R. (1990): Characterisation of an inhibitory monoclonal antibody-defined epitope on a malaria vaccine candidate antigen. *Immunology Letters*, **23**(4): 305-309.

RAMHARTER, M., SCHUSTER, K., BOUYOU-AKOTET, M. K., ADEGNIKA, A. A., SCHMITS, K., MOMBO-NGOMA, G., AGNANGJI, S. T., NEMETH, J., AFÈNE, S. N., ISSIFO, S., ONNAS, I. N., KOMBILA, M. and KREMSNER, P.G. (2007): Malaria in pregnancy before and after the implementation of a national IPTp program in Gabon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**(3): 418-422.

RAO, S. P., RIGGS, J. M., FRIEDMAN, D. F., SCULLY, M. S., LEBIEN, T. W. and SILBERSTEIN, L. E. (1999): Biased VH gene usage in early lineage human B cells: evidence for preferential Ig gene rearrangement in the absence of selection. *Journal of Immunology*, **163**(5): 2732-2740.

REMARQUE, E. J., FABER, B. W., KOCKEN, C. H. and THOMAS, A. W. (2008a): A diversity-covering approach to immunization with *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 induces broader allelic recognition and growth inhibition responses in rabbits. *Infection and Immunity*, **76**(6): 2660-2670.

REMARQUE, E. J., FABER, B. W., KOCKEN, C. M. H., THOMAS, A. W. (2008b): Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends in Parasitology*, **24**(2): 74-84.

RICHARDS, J. S. and BEESON, J. G. (2009): The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunology and Cell Biology*, **87**(5): 377-390.

RIGLAR, D. T., RICHARD, D., WILSON, D. W., BOYLE, M. J., DEKIWADIA, C., TURNBULL, L., ANGRISANO, F., MARAPANA, D. S., ROGERS, K. L., WHITCHURCH, C. B., BEESON, J. G., COWMAN, A. F., RALPH, S. A. and BAUM, J. (2011): Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Host Cell and Microbe*, **9**(1): 9-20.

ROBERT, X. and GOUET, P. (2014): Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, **42**: W320- W324.

ROBIN, G., SATO, Y., DESPLANCQ, D., ROCHEL, N., WEISS, E. and MARTINEAU, P. (2014): Restricted diversity of antigen binding residues of antibodies revealed by computational alanine scanning of 227 antibody-antigen complexes. *Journal of Molecular Biology*, pii: S0022-2836(14)00456-2. [Epub ahead of print]

Roche Lexikon Medizin. 4. Auflage. (1998) *Urban and Fischer Verlag*.

ROSS, R. (1897): On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. *British Medical Journal*, **2**(1929): 1786-1788.

- ROSS, R. (1898a): Pigmented cells in mosquitoes. *British Medical Journal*, **1**(1939): 550-551.
- ROSS, R. (1898b): The role of the mosquito in the evolution of the malaria parasite. *Lancet*, **2**: 488-489.
- RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP (2014): Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *Public Library of Science. Medicine*, **11**(7): e1001685.
- RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, AGNANDJI, S. T., LELL, B., FERNANDES, J. F., ABOSSOLO, B. P., METHOGO, B. G., KABWENDE, A. L., ADEGNIKA, A. A., MORDMÜLLER, B., ISSIFOU, S., KREMSNER, P. G., SACARLAL, J., AIDE, P., LANASPA, M., APONTE, J. J., MACHEVO, S., ACACIO, S., BULO, H., SIGAUQUE, B., MACETE, E., ALONSO, P., ABDULLA, S., SALIM, N., MINJA, R., MPINA, M., AHMED, S., ALI, A. M., MTORO, A. T., HAMAD, A. S., MUTANI, P., TANNER, M., TINTO, H., D'ALESSANDRO, U., SORGHO, H., VALEA, I., BIHOUN, B., GUIRAUD, I., KABORÉ, B., SOMBIÉ, O., GUIGUEMDÉ, R. T., OUÉDRAOGO, J. B., HAMEL, M. J., KARIUKI, S., ONEKO, M., ODERO, C., OTIENO, K., AWINO, N., MCMORROW, M., MUTURI-KIOI, V., LASERSON, K. F., SLUTSKER, L., OTIENO, W., OTIENO, L., OTSYULA, N., GONDI, S., OTIENO, A., OWIRA, V., OGUK, E., ODONGO, G., WOODS, J. B., OGUTU, B., NJUGUNA, P., CHILENGI, R., AKOO, P., KERUBO, C., MAINGI, C., LANG, T., OLOTU, A., BEJON, P., MARSH, K., MWAMBINGU, G., OWUSU-AGYEI, S., ASANTE, K. P., OSEI-KWAKYE, K., BOAHEN, O., DOSOO, D., ASANTE, I., ADJEI, G., KWARA, E., CHANDRAMOHAN, D., GREENWOOD, B., LUSINGU, J., GESASE, S., MALABEJA, A., ABDUL, O., MAHENDE, C., LIHELUKA, E., MALLE, L., LEMNGE, M., THEANDER, T. G., DRAKELEY, C., ANSONG, D., AGBENYEGA, T., ADJEI, S., BOATENG, H. O., RETTIG, T., BAWA, J., SYLVERKEN, J., SAMBIAN, D., SARFO, A., AGYEKUM, A., MARTINSON, F., HOFFMAN, I., MVALO, T., KAMTHUNZI, P., NKOMO, R., TEMBO, T., TEGHA, G., TSIDYA, M., KILEMBE, J., CHAWINGA, C., BALLOU, W. R., COHEN, J., GUERRA, Y., JONGERT, E., LAPIERRE, D., LEACH, A., LIEVENS, M., OFORI-ANYINAM, O., OLIVIER, A., VEKEMANS, J., CARTER, T., KASLOW, D., LÉBOULLEUX, D., LOUCQ, C., RADFORD, A., SAVARESE, B., SCHELLENBERG, D., SILLMAN, M. and VANSADIA, P. (2012): A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *New England Journal Medicine*, **367**(24): 2284-2295.
- RUDD, P. M., ELLIOTT, T., CRESSWELL, P., WILSON, I. A. and DWEK, R. A. (2001): Glycosylation and the immune system. *Science*, **291**(5512): 2370-2376.
- RYAN, J. L., KAUFMANN, W. K., RAAB-TRAUB, N., OGLESBEE, S. E., CAREY, L. A. and GULLEY, M. L. (2006): Clonal evolution of lymphoblastoid cell lines. *Laboratory Investigation*, **86**(11): 1193-1200.
- S**
- SABCHAREON, A., BURNOUF, T., OUATTARA, D., ATTANATH, P., BOUHAROUN-TAYOUN, H., CHANTAVANICH, P., FOUCAULT, C., CHONGSUPHAJAISIDDHI, T. and DRUILHE, P. (1991): Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **45**(3): 297-308.
- SAMBROOK, J. and RUSSELL, D. W. (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- SBLATTERO, D. and BRADBURY, A. (1998): A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions. *Immunotechnology*, **3**(4): 271-278.
- SCHNEIDER, J. D., MARILLONNET, S., CASTILHO, A., GRUBER, C., WERNER, S., MACH, L., KLIMYUK, V., MOR, T. S. and STEINKELLNER, H. (2014): Oligomerization status influences subcellular deposition and glycosylation of recombinant butyrylcholinesterase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology Journal*, **12**(7): 832-839.
- SCHOFIELD, L. and HACKETT, F. (1993): Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *The Journal of Experimental Medicine*, **177**(1): 145-153.
- SERGENT, E. and PARROT, L. (1935): L'immunité, la prémunition et la résistance innée. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, **3**: 279.
- SHAW, J. E., BAGLIA, L. A. and LEUNG, K. (1988): Maintenance of growth transformation with Epstein-Barr virus is mediated by secretion of autocrine growth factors in two serum-free B-cell lines. *Journal of Virology*, **62**(9): 3415-3421.

- SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J. V. and MANN, M. (2006): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, **1**(6): 2856-2860.
- SHI, B., MA, L., HE, X., WANG, X., WANG, P., ZHOU, L. and YAO, X. (2014): Comparative analysis of human and mouse immunoglobulin variable heavy regions from IMGT/LIGM-DB with IMGT/HighV-QUEST. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, **11**:30.
- SIDJANSKI, S. and VANDERBERG, J. P. (1997): Delayed migration of Plasmodium sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *The American Journal of Tropical medicine and Hygiene*, **57**(4): 426-429.
- SILMON DE MONERRI, N. C., FLYNN, H. R., CAMPOS, M. G., HACKETT, F., KOUSSIS, K., WITHERS-MARTINEZ, C., SKEHEL, J. M. and BLACKMAN, M. J. (2011): Global identification of multiple substrates for *Plasmodium falciparum* SUB1, an essential malarial processing protease. *Infection and Immunity*, **79**(3): 1086-1097.
- SILVIE, O., FRANETICH, J. F., CHARRIN, S., MUELLER, M. S., SIAU, A., BODESCOT, M., RUBINSTEIN, E., HANNOUN, L., CHAROENVIT, Y., KOCKEN, C. H., THOMAS, A. W., VAN GEMERT, G. J., SAUERWEIN, R. W., BLACKMAN, M. J., ANDERS, R. F., PLUSCHKE, G. and MAZIER, D. (2004): A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**(10): 9490-9496.
- SIMMONS, C. P., BERNASCONI, N. L., SUGUITAN, A. L., MILLS, K., WARD, J. M., CHAU, N. V., HIEN, T. T., SALLUSTO, F., HA DO, Q., FARRAR, J., DE JONG, M. D., LANZAVECCHIA, A. and SUBBARAO, K. (2007): Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza. *Public Library of Science. One*, **4**(5): e178.
- SIMONELLI, L., PEDOTTI, M., BELTRAMELLO, M., LIVOTI, E., CALZOLAI, L., SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A. and VARANI, L. (2013): Rational engineering of a human anti-dengue antibody through experimentally validated computational docking. *Public Library of Science. One*, **8**(3): e55561.
- SINNIS, P. (1998): An immunoradiometric assay for the quantification of Plasmodium sporozoite invasion of HepG2 cells. *Journal of Immunological Methods*, **221**(1-2): 17-23.
- SKEHEL, J. J. and WILEY, D. C. (2000): Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, **69**: 531-569.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. and KLENK, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, **150**(1): 76-85.
- SOUTO-CARNEIRO, M. M., MAHADEVAN, V., TAKADA, K., FRITSCH-STORK, R., NANKI, T., BROWN, M., FLEISHER, T. A., WILSON, M., GOLDBACH-MANSKY, R. and LIPSKY, P. E. (2009): Alterations in peripheral blood memory B cells in patients with active rheumatoid arthritis are dependent on the action of tumour necrosis factor. *Arthritis Research and Therapy*, **11**(3): R84.
- SRINIVASAN, P., BEATTY, W. L., DIOUF, A., HERRERA, R., AMBROGGIO, X., MOCH, J. K., TYLER, J. S., NARUM, D. L., PIERCE, S. K., BOOTHROYD, J. C., HAYNES, J. D. and MILLER, L. H. (2011): Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **108**(32): 13275-13280.
- STACE, J., BILLON, P., COATES, K. and STACE, N. (1982): Cerebral malaria in children: A retrospective study of admissions to Madang Hospital. *Papua New Guinea Medical Journal*, **25**(4): 230-234.
- STEENTOFT, C., VAKHRUSHEV, S. Y., JOSHI, H. J., KONG, Y., VESTER-CHRISTENSEN, M. B., SCHJOLDAGER, K. T., LAVRSEN, K., DABELSTEEN, S., PEDERSEN, N. B., MARCOS-SILVA, L., GUPTA, R., BENNETT, E. P., MANDEL, U., BRUNAK, S., WANDALL, H. H., LEVERY, S. B. and CLAUSEN, H. (2013): Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The European Molecular Biology Organization Journal*, **32**(10): 1478-1488.
- STEINITZ, M., KLEIN, G., KOSKIMIES, S. and MAKEL, O. (1977): EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*, **269** (5627): 420-422.
- STOTHARD, P. (2000): The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, **28**(6): 1102-1104.

STRASSER, R., STADLMANN, J., SCHÄHS, M., STIEGLER, G., QUENDLER, H., MACH, L., GLÖSSL, J., WETERINGS, K., PABST, M. and STEINKELLNER, H. (2008): Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnology Journal*, **6**(4): 392-402.

STUBBS, J., OLUGBILE, S., SAIDU, B., SIMPORE, J., CORRADIN, G. and LANZAVECCHIA, A. (2011): Strain-transcending Fc-dependent killing of *Plasmodium falciparum* by merozoite surface protein 2 allele-specific human antibodies. *Infection and Immunity*, **79**(3): 1143-1152.

STUBBS, J., SIMPSON, K. M., TRIGLIA, T., PLOUFFE, D., TONKIN, C. J., DURAISINGH, M. T., MAIER, A. G., WINZELER, E. A. and COWMAN, A. F. (2005): Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science*, **309**(5739): 1384-1387.

STURM, A., AMINO, R., VAN DE SAND, C., REGEN, T., RETZLAFF, S., RENNENBERG, A., KRUEGER, A., POLLOK, J. M., MENARD, R. and HEUSSLER, V. T. (2006): Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, **313**(5791): 1287-1290.

SUGIMOTO, M., TAHARA, H., IDE, T. and FURUICHI, Y. (2004): Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Research*, **64**(10): 3361-3364.

SUTHERLAND, C. J., TANOMSING, N., NOLDER, D., OGUIKE, M., JENNISON, C., PUKRITTAYAKAMEE, S., DOLECEK, C., HIEN, T. T., DO ROSÁRIO, V. E., AREZ, A. P., PINTO, J., MICHON, P., ESCALANTE, A. A., NOSTEN, F., BURKE, M., LEE, R., BLAZE, M., OTTO, T. D., BARNWELL, J. W., PAIN, A., WILLIAMS, J., WHITE, N. J., DAY, N. P., SNOUNOU, G., LOCKHART, P. J., CHIODINI, P. L., IMWONG, M. and POLLEY, S. D. (2010): Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *The Journal of Infectious Diseases*, **201**(10): 1544-1550.

T

TANNER, J., WEIS, J., FEARON, D., WHANG, Y. and KIEFF, E. (1987): Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping and endocytosis. *Cell*, **50**: 203-213.

TAYLOR, R. R., EGAN, A., MCGUINNESS, D., JEPSON, A., ADAIR, R., DRAKELY, C. and RILEY, E. (1996): Selective recognition of malaria antigens by human serum antibodies is not genetically determined but demonstrates some features of clonal imprinting. *International Immunology*, **8**(6): 905-915.

TETTEH, K. K. A., STEWART, L. B., OCHOLA, L. I., AMAMBUA-NGWA, A., THOMAS, A. W., MARSH, K., WEEDALL, G. D. and CONWAY, D. J. (2009): Prospective Identification of Malaria Parasite Genes under Balancing Selection. *Public Library of Science. One*, **4**(5): e5568.

THAM, W. H., SCHMIDT, C. Q., HAUHART, R. E., GUARIENTO, M., TETTEH-QUARCOO, P. B., LOPATICKI, S., ATKINSON, J. P., BARLOW, P. N. and COWMAN, A. F. (2011): *Plasmodium falciparum* uses a key functional site in complement receptor type-1 for invasion of human erythrocytes. *Blood*, **118**(7): 1923-1933.

THAM, W. H., WILSON, D. W., LOPATICKI, S., SCHMIDT, C. Q., TETTEH-QUARCOO, P. B., BARLOW, P. N., RICHARD, D., CORBIN, J. E., BEESON, J. G. and COWMAN, A. F. (2010): Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for *Plasmodium falciparum* PfRh4 invasion ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **107**(40): 17327-17332.

THEISEN, M., SOE, S., OEUVRAY, C., THOMAS, A. W., VUUST, J., DANIELSEN, S., JEPSEN, S. and DRUILHE, P. (1998): The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth *in vitro*. *Infection and Immunity*, **66**(1): 11-17.

THOMAS, A. W., NARUM, D., WATERS, A. P., TRAPE, J. F., ROGIER, C., GONÇALVES, A., ROSARIO, V., DRUILHE, P., MITCHELL, G. H. and DENNIS, D. (1994): Aspects of immunity for the AMA-1 family of molecules in humans and non-human primates malarial. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **89**(Suppl 2): 67-70.

THORLEY-LAWSON, D. A., CHESS, L. and STOMINGER, J. L. (1977): Suppression of *in vitro* Epstein-Barr virus infection: a new role for adult human T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, **146**(2): 495-508.

- TIEBOUT, R. F., SAUERWEIN, R. W., VAN DER MEER, W. G., VAN BOXTEL-OOSTERHOF, F. and ZEIJLEMAKER, W. P. (1987): Requirements for growth of Epstein-Barr virus-transformed cells at low cell densities. *Immunology*, **60**(2): 187-193.
- TILLER, T., MAKOTO, T., YURASOV, S., VELIZON, K., NUSSENZWEIG, M. C. and WARDEMANN, H. (2007): Autoreactivity in human IgG⁺ memory B cells. *Immunity*, **26**(2): 205-213.
- TILLER, T., MEFFRE, E., YURASOV, S., TSUIJI, M., NUSSENZWEIG, M. C. and WARDEMANN, H. (2008): Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *Journal of Immunological Methods*, **329**(1-2): 112-124.
- TOMAI, M. A., IMBERTSON, L. M., STANCZAK, T. L., TYGRET, L. T. and WALDTSCHMIDT, T. J. (2000): The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. *Cellular Immunology*, **203**(1): 55-65.
- TONKIN, M. L., ROQUES, M., LAMARQUE, M. H., PUGNIÈRE, M., DOUGUET, D., CRAWFORD, J., LEBRUN, M. and BOULANGER, M. J. (2011): Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science*, **333**(6041):463-467.
- TOSATO, G., PIKES, S. E., KOSKI, I. and BLAESE, R. M. (1982): Selective inhibition of immunoregulatory cell functions by cyclosporine A. *Journal of Immunology*, **128**(5): 1986-1991.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**(9): 4350-4354.
- TRAGER, W. and JENSEN, J. B. (1976): Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193**(4254): 673-675.
- TRAGGIAI, E., BECKER, S., SUBBARAO, K., KOLESNIKOVA, L., UEMATSU, Y., GISMONDO, M.R., MURPHY, B. R., RAPPUOLI, R. and LANZAVECCHIA, A. (2004): An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nature Medicine*, **10**(8): 871-875.
- TRAORE, B., KONÉ, Y., DOUMBO, S., DOUMTABÉ, D., TRAORÉ, A., CROMPTON, P. D., MIRCETIC, M., HUANG, C. Y., KAYENTAO, K., DICKO, A., SAGARA, I., ELLIS, R. D., MIURA, K., GUINDO, A., MILLER, L. H., DOUMBO, O. K. and PIERCE S. K. (2009): The TLR9 agonist CpG fails to enhance the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in semi-immune adults in Mali. *Vaccine*, **27**(52): 7299-7303.
- TREECK, M., ZACHERL, S., HERRMANN, S., CABRERA, A., KONO, M., STRUCK, N. S., ENGELBERG, K., HAASE, S., FRISCHKNECHT, F., MIURA, K., SPIELMANN, T. and GILBERGER, T. W. (2009): Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. *Public Library of Science. Pathology*, **5**(3): e1000322.
- TRIGLIA, T., DURAISINGH, M. T., GOOD, R. T. and COWMAN, A. F. (2005): Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, **55**(1): 162-174.
- TRIGLIA, T., HEALER, J., CARUANA, S. R., HODDER, A. N., ANDERS, R. F., CRABB, B. S. and COWMAN, A. F. (2000): Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Molecular Microbiology*, **38**(4): 706-718.
- TUTEJA, R. (2007): Malaria - an overview. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, **274**(18): 4670-4679.

V

- VAN DONGEN, J. J., LANGERAK, A. W., BRUGGEMANN, M., EVANS, P. A., HUMMEL, M., LAVENDER, F. L., DELABESSE, E., DAVI, F., SCHUURING, E., GARCÍA-SANZ, R., VAN KRIEKEN, J. H., DROESE, J., GONZÁLEZ, D., BASTARD, C., WHITE, H. E., SPAARGAREN, M., GONZÁLEZ, M., PARREIRA, A., SMITH, J. L., MORGAN, G. J., KNEBA, M. and MACINTYRE, E. A. (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, **17**(12): 2257-2317.

VÉZINA, L. P., FAYE, L., LEROUGE, P., D'AOUST, M. A., MARQUET-BLOUIN, E., BUREL, C., LAVOIE, P. O., BARDOR, M. and GOMORD, V. (2009): Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnology Journal*, **7**(5): 442-455.

VITALE, A. and DENECKE, J. (1999): The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *The Plant Cell*, **11**(4): 615-628.

VITALE, A. and PEDRAZZINI, E. (2005): Recombinant pharmaceuticals from plants: the plant endomembrane system as bioreactor. *Molecular Interventions*, **5**(4): 216-225.

VULLIEZ-LE NORMAND, B., TONKIN, M. L., LAMARQUE, M. H., LANGER, S., HOOS, S., ROQUES, M., SAUL, F. A., FABER, B. W., BENTLEY, G. A., BOULANGER, M. J. and LEBRUN, M. (2012): Structural and functional insights into the malaria parasite moving junction complex. *Public Library of Science. Pathology*, **8**(6): e1002755.

W

WALKER, L. M., PHOGAT, S. K., CHAN-HUI, P. Y., WAGNER, D., PHUNG, P., GOSS, J. L., WRIN, T., SIMEK, M. D., FLING, S., MITCHAM, J. L., LEHRMAN, J. K., PRIDDY, F. H., OLSEN, O. A., FREY, S. M., HAMMOND, P. W., PROTOCOL G PRINCIPAL INVESTIGATORS, KAMINSKY, S., ZAMB, T., MOYLE, M., KOFF, W. C., POIGNARD, P. and BURTON, D. R. (2009): Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science*, **326**(5950): 285-289.

WALLIKER, D., QUAKYI, I. A., WELLEMS, T. E., MCCUTCHAN, T. F., SZARFMAN, A., LONDON, W. T., CORCORAN, L. M., BURKOT, T. R. and CARTER, R. (1987): Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, **236**(4809): 1661-1666.

WANG, L., BLACK, C. G., MARSHALL, V. M. and COPPEL, R. L. (1999): Structural and antigenic properties of merozoite surface protein 4 of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, **67**(5): 2193-2200.

WEBSTER, D. E. and THOMAS, M. C. (2012): Post-translational modification of plant-made foreign proteins; glycosylation and beyond. *Biotechnology Advances*, **30**(2): 410-418.

WEINER, M. P. and COSTA, G. L. (1994): Rapid PCR site-directed mutagenesis. *PCR Methods and Applications*, **4**(3): S131-135.

WEINER, M. P., COSTA, G. L., SCHOETTLIN, W., CLINE, J., MATHUR, E. and BAUER, J.C. (1994): Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, **151**(1-2): 119-123.

WEITKAMP, J. H., KALLEWAARD, N., KUSUHARA, K., FEIGELSTOCK, D., FENG, N., GREENBERG, H. B. and CROWE, J. E. Jr. (2003): Generation of recombinant human monoclonal antibodies to rotavirus from single antigen-specific B cells selected with fluorescent virus-like particles. *Journal of Immunological Methods*, **275**(1-2): 223-237.

WELLEMS, T. E. and PLOWE, C. V. (2001): Chloroquine-resistant malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, **184**(6): 770-776.

WEST, A. P. Jr., GALIMIDI, R. P., FOGLESONG, C. P., GNANAPRAGASAM, P. N., KLEIN, J. S. and BJORKMAN, P. J. (2010): Evaluation of CD4-CD4i antibody architectures yields potent, broadly cross-reactive anti-human immunodeficiency virus reagents. *Journal of Virology*, **84**(1): 261-269.

WHITE, M. T., BEJON, P., OLOTU, A., GRIFFIN, J. T., BOJANG, K., LUSINGU, J., SALIM, N., ABDULLA, S., OTSYULA, N., AGNANDJI, S. T., LELL, B., ASANTE, K., OWUSU-AGYEI, S., MAHAMA, E., AGBENYEGA, T., ANSONG, D., SACARLAL, J., APONTE, J. J. and GHANI, A. C. (2014): A combined analysis of immunogenicity, antibody kinetics and vaccine efficacy from phase 2 trials of the RTS,S malaria vaccine. *BioMed Central Medicine*, **12**(1): 117.

WHO (2012): World Malaria Report 2012.

(http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/)

WHO (2013): World Malaria Report 2013.

(http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/)

WILLIAMS, A. R., DOUGLAS, A. D., MIURA, K., ILLINGWORTH, J. J., CHOUDHARY, P., MURUNGI, L. M., FURZE, J. M., DIOUF, A., MIOTTO, O., CROSNIER, C., WRIGHT, G. J., KWIATKOWSKI, R. M., FAIRHURST, R. M., LONG, C. A. and DRAPER, S. (2012): Enhancing blockade of *Plasmodium falciparum*

erythrocyte invasion: assessing combinations of antibodies against PfrH5 and other merozoite antigens. *Public Library of Science. Pathology*, **8**(11): e1002991.

WILSON, C. M. (1983): Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods in Enzymology*, **91**: 236-247.

WITTLER, R., BAUMGÄRTL, H., LÜBBERS, D. W. and SCHÜGERL, K. (1986): Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**(7): 1024-1036.

WRIGHT, A. and MORRISON, S. L. (1997): Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends in Biotechnology*, **15**(1): 26-32.

WURM, F. M. (2004): Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, **22**(11): 1393-1398.

WURTZ, N., BRIOLANT, S., GIL, M., PARQUET, V., HENRY, M., BARET, E., AMALVICT, R., ALMERAS, L., ROGIER, C. and PRADINES, B. (2010): Synergy of mefloquine activity with atorvastatin, but not chloroquine and monodesethylamodiaquine, and association with the pfmdr1 gene. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**(7): 1387-1394.

Y

YAHATA, K., TREECK, M., CULLETON, R., GILBERGER, T.-W. and KANEKO, O. (2012): Time-lapse imaging of red blood cell invasion by the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Public Library of Science. One*, **7**(12): e50780.

YAMAMOTO, H., KATSUKI, T., HARADA, S. and HINUMA, Y. (1981): Enhancement of outgrowth of EB virus-transformed cells from normal human peripheral blood by a tumor promoter, TPA. *International Journal of Cancer*, **27**(2): 161-166.

YUSIBOV, V., STREATFIELD, S. J. and KUSHNIR, N. (2011): Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. *Human Vaccines*, **7**(3): 313-321.

Z

ZEITLIN, L., BOHOROV, O., BOHOROVA, N., HIATT, A., KIM, D. O. H., PAULY, M. H., VELASCO, J., WHALEY, K. J., BARNARD, D. L., BATES, J. T., CROWE, J. E. Jr., PIEDRA, P. A. and GILBERT, B. E. (2013): Prophylactic and therapeutic testing of Nicotiana-derived RSV-neutralizing human monoclonal antibodies in the cotton rat model. *Monoclonal Antibodies*, **5**(2): 263-269.

ZHANG, D., LEE, H. F., PETTIT, S. C., ZARO, J. L., HUANG, N. and SHEN, W. C. (2012): Characterization of transferrin receptor-mediated endocytosis and cellular iron delivery of recombinant human serum transferrin from rice (*Oryza sativa* L.). *BioMed Central Biotechnology*, **12**: 92.

ZHANG, M. Y., SHU, Y., PHOGAT, S., XIAO, X., CHAM, F., BOUMA, P., CHOUDHARY, A., FENG, Y. R., SANZ, I., RYBAK, S., BRODER, C. C., QUINNAN, G. V., EVANS, T. and DIMITROV, D. S. (2003): Broadly cross-reactive HIV neutralizing human monoclonal antibody Fab selected by sequential antigen panning of a phage display library. *Journal of Immunological Methods*, **283**(1-2): 17-25.

ZHOU, T., GEORGIEV, I., WU, X., YANG, Z. Y., DAI, K., FINZI, A., KWON, Y. D., SCHEID, J. F., SHI, W., XU, L., YANG, Y., ZHU, J., NUSSENZWEIG, M. C., SODROSKI, J., SHAPIRO, L., NABEL, G. J., MASCOLA, J. R. and KWONG, P. D. (2010): Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science*, **329**(5993): 811-817.

ZHU, Z., CHAKRABORTI, S., HE, Y., ROBERTS, A., SHEAHAN, T., XIAO, X., HENSLEY, L. E., PRABAKARAN, P., ROCKX, B., SIDOROV, I. A., CORTI, D., VOGEL, L., FENG, Y., KIM, J. O., WANG, L. F., BARIC, R., LANZAVECCHIA, A., CURTIS, K. M., NABEL, G. J., SUBBARAO, K., JIANG, S. and DIMITROV, D. S. (2007): Potent cross-reactive neutralization of SARS coronavirus isolates by human monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **104**(29):12123-12128.

ZOUWENGA, R., D'AVINO, A. and ZIJLSTRA, G. (2010): Improving Productivity in Bioreactors. *Genetic Engineering and Biotechnology News*, **30**(7).

VIII. Anhang

VIII.1. Anmerkungen

Einleitung

¹ Etymologisch geht der Begriff zurück auf „mala aria“ (italienisch für „schlechte Luft“), der mit der Miasma Theorie Hippokrates‘ konform ist. Diese Theorie der schlechten Luft der Sümpfe hielt sich bis Alphonse Laveran in den 1880er Jahren Plasmodien im Blut Malariaerkrankter nachwies und Ronald Ross in den 1890er Jahren eindeutig Anophelesmücken als die Zwischenwirte und Überträger auf den Menschen identifizierte (LAVERAN, 1881; 1884; ROSS, 1897; 1898a; 1898b). Ihre Erkenntnisse wurden 1902 und 1907 jeweils mit einem Nobelpreis gewürdigt.

² *P. ovale* lässt sich außerdem differenzieren in zwei Subspezies; *P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* (SUTHERLAND *et al.*, 2010).

³ So sind *P. ovale* und *P. malariae* für die Malaria quartana (Fieber i.A. alle vier Tage), *P. vivax* für die Malaria tertiana (Fieber i.d.R. alle drei Tage), *P. knowlesi* für die Malaria quotidiana (Fieber im Abstand von ca. 24 h) und *P. falciparum* für die Malaria tropica mit unregelmäßigem Fieber verantwortlich (Roche Lexikon Medizin, 1998; COX-SINGH *et al.*, 2008).

⁴ Siehe hierzu auch Abbildung 31, in der die relativen Transkriptionslevel, die von BOZDECH und Kollegen (2003) für AMA1, MSP1 und MSP10 bestimmt wurden, grafisch dargestellt sind.

⁵ In der vorliegenden Arbeit sind dies Spender, die seit Jahren in der Ashanti Region in Ghana, einem malariaendemischen Gebiet, leben und eine Semi-Immunität gegen Malaria tropica aufweisen.

⁶ Unter Transformation wird die Veränderung der ursprünglichen Eigenschaften eukaryotischer Zellen, insb. in Bezug auf die Proliferation, verstanden. Dies kann durch Viren induziert werden (virokrine Transformation) oder durch Akkumulation von Mutationen, die den natürlichen Vorgang der Apoptose oder des Zellzyklus aushebeln. *In vivo* können derart entartete, transformierte Zellen der Ursprung von Krebs sein.

⁷ Erfolgt keine spezifische Anreicherung der B Lymphozyten vor der Infektion mit EBV ist erstens die Gefahr größer, dass vielversprechende Zellen von unspezifischen Lymphoblasten überwachsen werden; zweitens müsste damit gerechnet werden, dass alleine der Aufwand der Aussaat der Zellen und der Analyse der Zellkulturüberstände mittels ELISA um den Faktor 40 bis 50 höher wäre.

⁸ Bei einer monoklonalen Kultur werden weniger PCRs vonnöten sein als bei einer oligoklonalen Kultur, die mRNA unterschiedlicher Antikörper enthält, die nicht mit allen, zur Sicherung genutzten Oligonukleotiden, gleich gut zu amplifizieren ist.

⁹ Die Expression von Antikörpern in Pflanzen hat sich seit der ersten Produktion eines murinen Volllängenantikörpers in Tabak (HIATT *et al.*, 1989) wiederholt bewährt. Immunglobulinen aus Säugern und ihre entsprechenden rekombinanten Gegenstücke aus Pflanzen sind dieselben Antigenbindungs- und Neutralisationseigenschaften gemein (vgl. z.B. MA *et al.*, 1994; YUSIBOV *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013). Darüber hinaus ist die Produktion in Pflanzen im Vergleich zu jener in Säugetierzellen u.a. deswegen vorteilhaft, da Pflanzen nicht steril gehandhabt werden müssen und sie keine komplexen Medien zum Wachstum und zur Expression des Zielproteins benötigen (HUANG *et al.*, 2010; ZEITLIN *et al.*, 2013).

Material und Methoden

¹⁰ *P. falciparum* K1 stammt aus Thailand, W2mef aus Südostasien, HB3 aus Honduras und FCR-3 aus Gambia (JENSEN und TRAGER, 1978; BHASIN und TRAGER, 1984; FOWLER *et al.*, 2002; KORSINCZKY *et al.*, 2000). Stamm 3D7 wurde durch Subklonierung des *P. falciparum*-Isolats NF54 isoliert (WALLIKER *et al.*, 1987). NF54 stammt aus einem Spender, welcher in der Nähe des Amsterdamer Flughafens (Niederlande) lebte; der exakte geographische Ursprung des Isolats NF54 und folglich auch des Stamms 3D7 ist nicht genau bekannt (WALLIKER *et al.*, 1987; MILLER *et al.*, 1993).

¹¹ Die Antigene AMA1 (DiCo 1+2+3), MSP3, Pf38, PIMP, und E25T wurden von Jürgen Drossard (AMA1 (DiCo 1+2+3)), Helga Schinkel (MSP3 und Pf38), Robin Kastilan (PIMP) und Alexander Boes (E25T) zur

Verfügung gestellt. PIMP und E25T sind Multidomänenproteine. PIMP beherbergt Epitope von MSP4, PfRh5, EBA-175, Pfs25 und CSP. E25T enthält Bereiche von MSP1₉, MSP4, MSP8, MSP10, Pfs25 und CSP.

¹² Es sind stets *Plasmodium falciparum*-Antigene gemeint, falls nicht explizit andere Vertreter der *Apicomplexa* angegeben sind.

¹³ In Maastricht wurde das „FACSaria II“ Durchflusszytometer von Jozien Jaspers-Spits bedient. Rolf Fendel bediente das „BD Influx“ Gerät in Aachen.

¹⁴ Zur Erläuterung der Funktionsweise von CFCA Messungen sei auf die Publikationen von POL *et al.* (2007) und WILLIAMS *et al.* (2012) verwiesen.

¹⁵ Die Antikörper mAb1D7, mAb4G2 und mAb1F9, welche alle für AMA1 spezifisch sind, vermögen gleichzeitig an AMA1 zu binden, da ihre jeweiligen Epitope nicht überlappen. MAb1D7 bindet weit entfernt von der hydrophoben Bindungsfurche des AMA1.

¹⁶ Die Bilder wurden von Rolf Fendel aufgenommen.

¹⁷ Der tryptische Verdau und die die Analyse der Peptide mittels HPLC und Massenspektrometrie wurden von Ivana Chudobová und Michael Kupper durchgeführt.

¹⁸ Unter Zelllinie wird hier eine Kultur verstanden, die auf eine einzige Zelle zurückgeht. Zellreihen hingegen sind nicht monoklonal und können eine Mischpopulation mehrerer B Zellklone sein.

¹⁹ Die Fähigkeit der Überstände B Zellen zu transformieren wurde mithilfe von Testtransformationen mit frischen PBMCs untersucht (nicht dargestellt). Zwar lässt sich die Anzahl der Kopien des EBV Genoms je mL mittels „real time“-PCR feststellen, jedoch lässt diese Art der Analyse keinen direkten Rückschluss auf die Qualität der kryokonservierten Viruspartikel und deren Infektiosität zu. Eine Testtransformation gibt hier mehr Aufschluss.

²⁰ Die PBMCs ghanaischer Spender wurden von Otchere Addai-Mensah und Rolf Fendel in Zusammenarbeit mit Maragret Frempong am KCCR in Kumasi, Ghana, isoliert und kryokonserviert.

²¹ In Ghana gehen fast alle Malariaerkrankungen auf *P. falciparum* zurück; außerdem ist Ghana in Bezug auf die *P. falciparum*-Transmission holoendemisch. Es kommen 1 - 7,5 klinische Fälle auf 1000 Menschen pro Jahr (WHO, 2012).

²² Dies wurde vor Ort von einem Arzt mithilfe einer Anamnese festgestellt.

²³ Summe der Clusterfläche [mm^2] $\sum_{i=1}^k G_i \cdot i$. Mit i : Anzahl der Cluster einer bestimmten Größe; $i = 1 \dots k$; $i \in \mathbb{N} \setminus \{0\}$; G_i : Größe eines Clusters in mm^2 . Mehrere Aspekte sind maßgeblich für die Wahl der Summe der Clusterfläche als Maß der Transformationseffizienz. Zum einen sind die Zellaggregate und deren Größenverteilung sehr heterogen. Zum anderen sind die Zellaggregate nicht monoklonal und spiegeln daher folglich nicht das Zellwachstum einzelner, erfolgreich transformierter B Zellen wider.

²⁴ Diese Zeitspanne bis zum Testen der Überstände und der erneuten Fütterung/ Expansion der Zellen hängt stark von der Proliferation der Zellen ab. Je weniger Zellen je Napf vorgelegt und/ oder erfolgreich latent infiziert wurden, desto länger dauerte es bis ein ELISA durchgeführt und die Zellen expandiert werden konnten.

²⁵ LCLs tendieren dazu in Aggregaten zu wachsen, die mit dem bloßen Auge sichtbar sind und dazu führen können, dass im Inneren gelegene Zellen unterversorgt sind. Diesen Effekt beobachtet man bei auch bei kugelförmigen Pilzmycelien in Submerskultur (WITTLER *et al.*, 1986).

²⁶ Die initiale Parasitämie hing davon ab, wie stark die jeweiligen Stämme proliferierten. So zeigten Dd2 und HB3 bspw. ein starkes Wachstum (Faktor 7 in 48 h); FCR-3 war wachstumsschwächer (Faktor 1,5 - 2 in 48 h).

²⁷ Die Kontrollreagenzien wurden von Ed Remarque (BG98), Alexander Boes (unspezifisches, polyklonales Kaninchen-IgG) und Jürgen Drossard (2G12) zur Verfügung gestellt.

²⁸ Mab 2G12 ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der sich gegen ein mannosereiches Epitop des gp120 Proteins von HIV-1 richtet (GRAM *et al.*, 1994; CALARESE *et al.*, 2003).

²⁹ Diese Analyse wurde von Rolf Fendel übernommen.

³⁰ Dies wurde von Claudia Hansen und Raphael Sœur durchgeführt.

³¹ Diese Chromatographien wurden von Stefan Rasche durchgeführt.

³² Die Reinigungsschritte ab der Filtration durch Gase (Miracloth) und die Chromatographie führten Alexander Boes und Stefan Rasche durch.

Ergebnisse

³³ PBMCs enthalten durchschnittlich 15% B Lymphozyten (PALMER *et al.*, 2006); CD19⁺ / CD27⁺ Gedächtnis B Zellen stellen 20-32% der peripheren B Zellen gesunder Spender dar (SOUTO-CARNEIRO *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2010). TRAORE *et al.* (2009) fanden 0,03-0,05% AMA1-spezifische bezogen auf alle peripheren Gedächtnis B Zellen. Damit lässt sich ein Prozentsatz von 0,0009-0,0024% der Gedächtnis B Lymphozyten im peripheren Blut, deren Antikörper ein bestimmtes Malariaantigen erkennen, berechnen.

³⁴ Zum einen konnte keine reproduzierbare Qualität garantiert werden, da die Quelle der PBMCs heterogen in der Art ist, dass (1) die jeweiligen Spender sich genetisch unterscheiden, sich unterschiedlich ernähren und möglicherweise Medikamente einnehmen und (2) die Buffycoats, aus denen die PBMCs isoliert wurden, unterschiedlich lange bei Raumtemperatur lagen bis sie bei der Transfusionsmedizin (Uniklinik Aachen) abgeholt werden durften.

³⁵ Zu diesem Zeitpunkt standen MSP3, Pf38 und die Multidomänenproteine E25T und PIMP noch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung.

³⁶ Sowohl Spender 0010 als auch Spender 0013 wurden ausgesucht, da deren Serum-IgG (1) im ELISA stark mit verschiedensten plasmodialen Antigenen reagierte (u.a. AMA1, E25T) und (2) *P. falciparum* 3D7 *in vitro* zu inhibieren vermochte. Für die entsprechenden Daten sei auf die Arbeiten von Otchere Addai-Mensah und Stephanie Kapelski verwiesen.

³⁷ LCLs benötigen ohne Versorgerzellen eine Zelldichte von 1000 Zellen je mL in RPMI 1640 + 20% (V/V) FKS in 20 µL in 96-Napf-Rundbodenplatten (20 Zellen je Napf), um wieder anzuwachsen. Werden weniger Zellen eingesetzt, sterben die Zellen durch Apoptose/ Anoikis. Diese Daten wurden im Rahmen eines Forschungspraktikums 2008 ermittelt.

³⁸ Bei der Sicherung und Klonierung der V_H-, V_K- und V_λ-Sequenzen der in Maastricht transformierten B Zellen halfen Susanne Bethke und Melanie Seidel. Bei der Klonierung der V_H-, V_K- und V_λ-Bereiche der in Aachen generierten LCLs half Michael Krolik.

³⁹ Im Falle der Sequenzen der in Maastricht transformierten Zellen war dies oftmals nicht nachvollziehbar. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass die Information über den Isotyp bei der verschachtelten PCR mit V- und J_H-spezifischen Primern verlorengelht.

⁴⁰ Dies kann mit Sicherheit gesagt werden, da alle Amplikons unabhängiger PCR-Reaktionen diese Mutation aufwiesen.

⁴¹ Bei Testexpressionen der rekombinanten Antikörper aus den in Maastricht erzeugten LCLs halfen Susanne Bethke und Melanie Seidel. Michael Krolik half bei Testexpressionen der rekombinanten IgG, welche aus B Zellen stammten, die in Aachen transformiert worden waren.

⁴² Die Bestimmung von Abschnitten war insbesondere dann nicht möglich, wenn sie nicht von Gensegmenten kodiert waren, sondern als N-Nukleotide bei der Zusammenstellung der V-, (D-) und J-Gensegmente in der B Zellentwicklung *de novo* erzeugt wurden.

⁴³ HumAb10.1 trägt die schwere Kette des humAb10.2 und die leichte Kette des humAb10.3. Es gibt folglich keine lymphoblastoide Zelllinie, die diesen Antikörper sezerniert. Die cDNS zur Sicherung der variablen Bereiche des humAbAMA1 wurde fünf Wochen nach der EBV Infektion der B Zellen gewonnen. Es liegt keine humane Zellreihe vor, die diesen Antikörper produziert.

⁴⁴ Wenngleich dieselben Seren auch gegen andere rekombinant exprimierte plasmodiale Proteine getestet wurden, so z.B. gegen MSP4, PIMP und Pf38, werden an dieser Stelle lediglich die Ergebnisse der ELISA mit MSP10 und AMA1 dargestellt. MSP4, PIMP und Pf38 wurden ebenfalls von den ghanaischen Seren erkannt, nicht jedoch von Seren naiver Spender.

⁴⁵ Der Mittelwert der Mittelwerte der Extinktion bei dsRed-MSP10-EGF1 lag bei 100-facher Verdünnung bei 0,414 (± 0,383). Der entsprechende Wert bei dsRed-MSP10-EGF2 lag bei 0,303 (± 0,243). Der Mittelwert der Mittelwerte bei 1:100 Verdünnung des dsRed lag bei 0,131 (± 0,027). Sowohl für dsRed-MSP10-EGF1 als auch

für dsRed-MSP10-EGF2 waren diese Unterschiede signifikant ($p < 0,0001$ bzw. $p < 0,002$ im zweiseitigen t-Test).

⁴⁶ Der gemittelte Mittelwert der Extinktion bei nativen E25T lag bei 0,720 ($\pm 0,198$), jener des reduzierten Pendants bei 0,108 ($\pm 0,034$). Der Unterschied erwies sich in einem zweiseitigen t-Test als signifikant ($p < 0,0001$).

⁴⁷ Der Mittelwert der Mittelwerte der Extinktion bei der nativen Variante des AMA1 3D7 lag bei 0,610 ($\pm 0,220$) und bei der reduzierten Form bei 0,258 ($\pm 0,188$). Im zweiseitigen t-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$).

⁴⁸ Diese Messungen wurden freundlicherweise von Holger Spiegel durchgeführt.

⁴⁹ AMA1 FCR-3/FVO und AMA1 HB3 wurden freundlicherweise von Ed Remarque zur Verfügung gestellt.

Diskussion

⁵⁰ DMEM enthält z.B. im Gegensatz zu RPMI weniger Arginin, weniger myo-Inosit, kein Asparagin und keine Asparaginsäure, dafür jedoch höhere Konzentrationen der Aminosäuren Glycin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tryptophan und Valin sowie höhere Gehalte der Vitamine Folsäure, Niacinamid, D-Panthenol, Pyridoxin, Riboflavin und Thiamin.

⁵¹ Siehe Fußnote 50.

⁵² In diesem Experiment wurden 100.000 frische PBMCs je Napf verwendet und mit einem Volumenanteil von 6,25% konditioniertem, vier Tage altem Medium in RPMI 1640-basiertem Medium transformiert. Der Einfluss des Kasumi-1 Zellkulturüberstands war signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit unverbrauchtem Medium ($p < 0,01$ in einem zweiseitigen t-Test). Wollte man die verantwortlichen löslichen Faktoren genauer analysieren, böte es sich an ein Zytokinprofil der Kulturüberstände der Kasumi-1 und der erfolgreich transformierten LCLs zu erstellen.

⁵³ Diesem Phänomen ließe sich mithilfe einer durchflusszytometrischen Messung auf den Grund gehen, indem die Population der zum Wachstum angeregten Zellen hinsichtlich der vorhandenen, charakteristischen Oberflächenmarker analysiert wird. Geeignete Oberflächenmarker wären CD3, CD4, CD8 für T Zellen, CD19, CD21, CD22 und B Zellrezeptoren (surface IgG, sIgA, sIgE, sIgM) für B Zellen, CD16 und CD56 für NK Zellen sowie CD14 und CD64 für Monozyten / Makrophagen.

⁵⁴ Siehe Fußnote 33.

⁵⁵ Mit den zur Sortierung und für den ELISA eingesetzten Proteinen MSP1₁₉, AMA1, MSP3, Pf38, E25T und PIMP sind insgesamt Epitope von elf *P. falciparum* Antigenen abgedeckt. E25T enthält Epitope von MSP1, MSP4, MSP8, MSP10, Pfs25 und CSP. PIMP setzt sich zusammen aus Bereichen von MSP4, PfRh5, EBA-175, Pfs25 und CSP.

⁵⁶ Der genaue Zeitpunkt der Analyse geht aus der entsprechenden Publikation jedoch nicht hervor.

⁵⁷ Dieser Aspekt wurde adressiert, indem eine Reamplifikation der Produkte der Spektrotyping PCR durchgeführt wurde und deren Fragmente erneut analysiert wurden (nicht dargestellt). Allerdings zeigte sich damit keine Verbesserung. Auch hier zeigten 60% der Kulturen kein Amplikon, darunter Kultur 1/E4; 27% erschienen monoklonal, 13% erschienen triklonal.

⁵⁸ In vielen anderen Publikationen, in denen humAbs beschrieben werden, die mittels EBV Transformation generiert wurden, finden sich keine Angaben zur initial eingesetzten Anzahl der B Zellen (vgl. ZHU *et al.*, 2007; CORTI *et al.*, 2010a; MACAGNO *et al.*, 2010; STUBBS *et al.*, 2011; LINDESMITH *et al.*, 2012).

⁵⁹ Zwar könnte dies auch durch eine suboptimale Anreicherung, etwa durch Kreuzreaktivität unspezifischer B Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antigenen zurückzuführen sein. Allerdings wurde in Vorabversuchen mit B Zellen europäischer Spender keine Reaktivität mit ebendiesen Antigenen festgestellt (nicht dargestellt).

⁶⁰ An dieser Stelle mangelt es an direkten Vergleichswerten, denn bisher wurde die EBV Transformation antigenspezifisch sortierter B Zellen noch nicht beschrieben.

⁶¹ Die Beanspruchung personeller und materieller Ressourcen war hingegen signifikant geringer.

- ⁶² Die Information über Stufen zwischen dem nicht mutierten Vorläufer und humAbAMA1 könnte gewonnen werden, indem AMA1-bindende B Zellen des Spenders 0010 durchflusszytometrisch angereichert und deren V_H-Bereiche sequenziert würden. Dies wäre analog zur Herangehensweise von LIAO *et al.*, 2013 und DORIA-ROSE *et al.*, 2014 zur Analyse der *in vivo* Entwicklung von HIV-1 Antikörpern mit breitem Wirkungsspektrum.
- ⁶³ Zwar wird der Zeitbedarf einer Affinitätsreifung vom Grad der Variabilität des Zielantigens, dessen Häufigkeit und dem Grad und der Häufigkeit der Exposition mit dem dazugehörigen Pathogen abhängen. So ist anzunehmen, dass die Entwicklung hochpotenter HIV-1-spezifischer bnAbs durch die hohe Variabilität der viralen Proteine und die ständige Exposition mit unterschiedlichsten Quasispezies schneller vonstatten gehen könnte als die Entwicklung hochpotenter anti-plasmodialer Antikörper. Die erforderliche Zeit der Reifung der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Antikörper wird daher möglicherweise unterschätzt.
- ⁶⁴ Diesem Aspekt wird unter Abschnitt IV.10.1. mehr Aufmerksamkeit geschenkt.
- ⁶⁵ Nur 9 der 31 Seren erkannten MSP4-EGF bei 1:100-facher Serumverdünnung stark ($E_{405nm} > 0,5$) (nicht dargestellt).
- ⁶⁶ Es ist darüber hinaus möglich, dass Antikörper nicht nur die Affinität sondern sogar die Spezifität gänzlich verlieren. So erkannten humAb10.3 und humAbAMA1 ihre Zielantigene nicht mehr, wenn sie andere als die jeweiligen authentischen leichten Ketten trugen (vgl. Abbildung 13(A); humAbAMA1 Daten nicht dargestellt).
- ⁶⁷ Andere Mitglieder der Anionenaustauscherfamilie, wie AE2 und AE3, welche 74% bzw. 68% Sequenzhomologie mit AE1 aufweisen, sind jedoch nicht auf humanen roten Blutkörperchen vorhanden (MEDINA *et al.*, 1997; LOHI *et al.*, 2002).
- ⁶⁸ Auf die Möglichkeit der Untersuchung der Interaktionspartner des MSP10 wird im Ausblick näher eingegangen.
- ⁶⁹ Direkt vergleichbare Werte zur durch die MSP10-spezifischen humAbs bedingten Inhibition gibt es in der Literatur nicht. So wurde z.B. die Inhibition durch mAb12.8 und mAb12.10 nicht wie in der vorliegenden Arbeit mit dem pLDH-basierten Test durchgeführt, sondern durch mikroskopische Bestimmung der Parasitämie (vgl. BLACKMAN *et al.*, 1990; LAZAROU *et al.*, 2009). MAb12.8 und mAb12.10 waren schon bei Konzentrationen von 0,1 – 1 mg/mL aktiv (BLACKMAN *et al.*, 1990, Abbildung 4; LAZAROU *et al.*, 2009, Abbildung 5).
- ⁷⁰ MSP1 wird durch die Subtilisin-ähnlichen Proteasen 1 und 2 (SUB1 und SUB2) gespalten (CHILD *et al.*, 2010). Für SUB1 wurde eine Konsensussequenz identifiziert: I/L/V-T-X-G/A-II-↓-X (X: beliebiger Aminosäurerest; II: polare Aminosäureseitenkette; ↓: Spaltung) (SILMON DE MONERRI *et al.*, 2011). MSP10 enthält jedoch kein solches Sequenzmotiv. Neben SUB1 könnten noch SUB2 oder SUB3 in Frage kommen. Letzteres wurde 2013 von ALAM *et al.* (2013) beschrieben. Etwaige Konsensussequenzen sind bei diesen beiden Enzymen jedoch noch nicht bekannt.
- ⁷¹ Nach der Präinvasionsphase wird schließlich die „Moving Junction“ ausgebildet; der Merozoit dringt in den Erythrozyten ein und die Echinozytosephase beginnt, in der die parasitophore Vakuole gebildet wird und das Blutkörperchen die namensgebende morphologische Deformation durchläuft (YAHATA *et al.*, 2012).
- ⁷² Andere anti-plasmodiale Antikörper, wie murine PfRh5-spezifische IgG zeigen EC₅₀-Werte in einem ähnlichen Bereich (50-100 µg/mL) (DOUGLAS *et al.*, 2014). MSP1-spezifische, polyklonale IgG semi-immuner Spender weisen EC₅₀-Werte von 390 µg/mL bis 2,04 mg/mL auf (MIURA *et al.*, 2009).
- ⁷³ *Toxoplasma gondii*, welche wie Plasmodien dem Stamm der Apicomplexa angehören, besitzt hingegen solche paraloge Proteine sporogAMA1 und sporogRON2 neben TgAMA1 und TgRON2 (POUKCHANSKI *et al.*, 2013).
- ⁷⁴ In Bezug auf den Polymorphismus der Reste, die diese essentielle Ligandenbindungsstelle umgeben, liegt eine Analogie zu den variablen Bereichen der Rezeptoren anderer Humanpathogene vor, wie z.B. bei gp120 (HIV-1) und dessen CD4-Bindungsstelle und bei Hämagglutinin (Influenzaviren) und dessen Sialinsäure-Bindungstasche (SKEHEL und WILEY, 2000; CHEN *et al.*, 2005; BAI *et al.*, 2005).
- ⁷⁵ Mit zunehmendem Alter werden zwar das Spektrum der anti-plasmodialen Antikörper breiter und der Immunschutz immer besser (vgl. BAIRD, 1995; CHELIMO *et al.*, 2005; OSIER *et al.*, 2008), jedoch ist ein hoher anti-plasmodialer Antikörpertiter nicht notwendigerweise gleichbedeutend mit einer protektiven Immunantwort (CHUANGCHAIYA und PERSSON, 2013).

Ausblick

⁷⁶ Die „Moving Junction“, zwischen Merozoit und rotem Blutkörperchen, die sich ohne die AMA1:RON2-Interaktion nicht ausbildet (LAMARQUE *et al.*, 2011), wandert während der Invasion wie ein versiegelnder Ring entlang des Merozoiten bis sich ebendieser vollständig in das rote Blutkörperchen gezogen und sich die Erythrozytenmembran wieder geschlossen hat (AIKAWA *et al.*, 1978, 1981; RIGLAR *et al.*, 2011). Nach diesem Verschluss bleibt die enge Verbindung der Merozoitenmembran und der neu gebildeten Membran der parasitophoren Vakuole im Erythrozyteninneren bestehen (AIKAWA *et al.*, 1978, Abbildung 8). Dieser Umstand und die Tatsache, dass sich AMA1 nach der Invasion immer noch am anterioren und am posterioren Ende des Merozoiten im Inneren des roten Blutkörperchens befindet (RIGLAR *et al.*, 2011, Abbildung 2(A) und (B)), sprechen dafür, dass AMA1-Spaltprodukte keinesfalls vollständig in das Plasma gelangen.

⁷⁷ Falls die Wirksamkeit des humAbAMA1 tatsächlich durch im Plasma befindliche Spaltprodukte des AMA1 herabgesetzt werden könnte, könnte man dieser Problematik durch eine vorherige therapeutische Plasmapherese begegnen oder indem humAbAMA1 mehrfach – mit einem adäquaten zeitlichen Abstand – verabreicht wird.

⁷⁸ Sowohl das erste als auch das zweite EGF-Motiv des MSP10 besitzen jeweils weniger als 50% Homologie mit humanen EGF-Motiven; lässt man die konservierten Cystinknotenmotive außer Betracht, liegt die Homologie sogar jeweils unter 35%. Die größte Homologie zu MSP10-EGF1 besitzt ein Abschnitt des humanen Proteins Interphotorezeptor Matrix Proteoglykan 1 (Aminosäurereste 470-498) mit 45,2%. Die größte Homologie zu MSP10-EGF2 hat ein Teil des humanen Proteins MEGF7 (Aminosäurereste 28-55) mit 46,3%. Die Analyse erfolgte mithilfe des Algorithmus „blastp“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

VIII.2. Transkriptionslevel von AMA1, MSP1 und MSP10

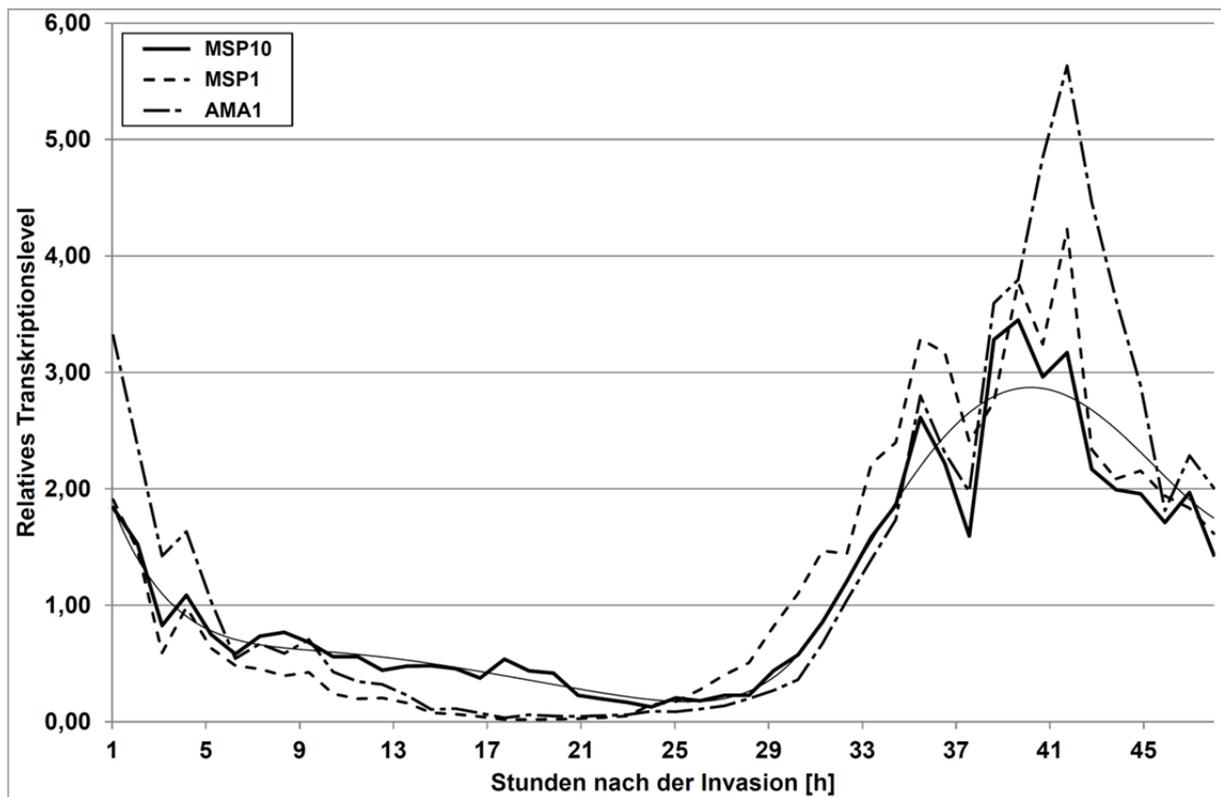


Abbildung 31: Grafische Darstellung der relativen Transkriptionslevel von *P. falciparum* AMA1, MSP1 und MSP10 während der 48 Stunden eines asexuellen Entwicklungszyklus im Blut. Die Rohdaten entstammen den zusätzlichen Information der Publikation von BOZDECH *et al.* (2003), Tabelle S7.

VIII.3. Oligonukleotide

Tabelle 19: Primer aus TILLER *et al.* (2008), die in der vorliegenden Arbeit zur Sicherung und Klonierung variabler Bereiche humaner Antikörper verwendet wurden. Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichung markiert.

Bezeichnung	Sequenz
Primer für die Sicherung und Klonierung von V_H-Bereichen:	
5' L-VH 1	5'-ACAGGTGCCACTCCCAGGTGCAG-3'
5' L VH 3	5'-AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG-3'
5' L-VH 4/6	5'-CCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAG-3'
5' L-VH 5	5'-CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG-3'
5' AgeI VH 1	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG-3'
5' AgeI VH 1/5	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG-3'
5' AgeI VH 3	5'CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG-3'
5' AgeI VH 3-23	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG-3'
5' AgeI VH 4	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG-3'
5' AgeI VH 4-34	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG-3'
5' AgeI VH 1-18	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAG-3'
5' AgeI VH 1-24	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATCCCAGGTCCAGCTGGTACAG-3'
5' AgeI VH 3-33	5'CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG-3'
5' AgeI VH 3-9	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAG-3'
5' AgeI VH4-39	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATCCCAGCTGCAGCTGCAGGAG-3'
5' AgeI VH 6-1	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATCCCAGGTACAGCTGCAGCAG-3'
3' C _γ CH 1	5'GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC-3'
3' C _μ CH 1	5'-GGGAATTCTCACAGGAGACGA-3'
3' Sall JH 1/2/4/5	5'-TGCGAAGT <u>CGACG</u> CTGAGGAGACGGTGACCAG-3'
3' Sall JH 3	5'-TGCGAAGT <u>CGACG</u> CTGAAGAGACGGTGACCATTG-3'
3' Sall JH 6	5'TGCGAAGT <u>CGACG</u> CTGAGGAGACGGTGACCGTG-3'
Primer für die Sicherung und Klonierung von V_K-Bereichen:	
5' L V _K 1/2	5'-ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG-3'
5' L V _K 3	5'-CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAG-3'
5' L V _K 4	5'-ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG-3
5' AgeI V _K 1-5	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTC-3'
5' AgeI V _K 1-9	5'-TTGTGCTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCAGACATCCAGTTGACCCAGTCT-3'
5' AgeI V _K 1D-43	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC-3'
5' AgeI V _K 2-24	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGGGGATATTGTGATGACCCAGAC-3'
5' AgeI V _K 2-28	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGGGGATATTGTGATGACTCAGTC-3'
5' AgeI V _K 2-30	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGGGGATGTTGTGATGACTCAGTC-3'
5' Age V _K 3-11	5'-TTGTGCTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCAGAAATTGTGTTGACACAGTC-3'
5' Age V _K 3-15	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCAGAAATAGTGATGACGCAGTC-3'
5' Age V _K 3-20	5'-TTGTGCTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCAGAAATTGTGTTGACGCAGTCT-3'
5' Age V _K 4-1	5'-CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCGGACATCGTGATGACCCAGTC-3'
3' C _K 543	5'-GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA-3'
3' C _K 494	5'-GTGCTGTCTTGCTGTCTGCTGCT-3'

Tabelle 19. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz
3' BsiWI Jk 1/4	5'-GCCACCGTACGTTTGATYTCCACCTTGGTC-3'
3' BsiWI Jk 2	5'-GCCACCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC-3'
3' BsiWI Jk 3	5'-GCCACCGTACGTTTGATATCCACTTGGTC-3'
3' BsiWI Jk 5	5'-GCCACCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC-3'
Primer für die Sicherung und Klonierung von V_λ-Bereichen:	
5' L Vλ 1	5'-GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG-3'
5' L Vλ 2	5'-GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG-3'
5' L Vλ 3	5'-GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG-3'
5' L Vλ 4/5	5'-GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG-3'
5' L Vλ 6	5'-GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG-3'
5' L Vλ 7	5'-GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG-3'
5' L Vλ 8	5'-GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG-3'
5' AgeI Vλ 1	5'-CTGCTACCGGTTCCCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG-3'
5' AgeI Vλ 2	5'-CTGCTACCGGTTCCCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG-3'
5' AgeI Vλ 3	5'-CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG-3'
5' AgeI Vλ 4/5	5'-CTGCTACCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA-3'
5' AgeI Vλ 6	5'-CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG-3'
5' AgeI Vλ 7/8	5'-CTGCTACCGGTTCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG-3'
3' Cλ	5'-CACCAGTGTGGCCTTGTGGCTTG-3'
3' XhoI Cλ	5'-CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG-3'

Tabelle 20: Primer für die Fragmentanalyse. Diese Oligonukleotide entsprechen jenen, die von FRAUSSEN *et al.* (2010) publiziert wurden.

Bezeichnung	Sequenz
Vorwärtsoligonukleotide für die Gerüstregion 1 humaner V_H Bereiche:	
VH1-FR1	5'-GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG-3'
VH2-FR1	5'-GTCTGGTCCTACGCTGGTCAAACCC-3'
VH3-FR1	5'-CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG-3'
VH4-FR1	5'-CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG-3'
VH5-FR1	5'-CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT-3'
VH6-FR1	5'-TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG-3'
Vorwärtsoligonukleotide für die Gerüstregion 2 humaner V_H Bereiche:	
VH1-FR2	5'-CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA-3'
VH2-FR2	5'-TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG-3'
VH3-FR2	5'-GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA-3'
VH4-FR2	5'-TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG-3'
VH5-FR2	5'-GGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAGG-3'
VH6-FR2	5'-TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG-3'
VH7-FR2	5'-TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA-3'
Vorwärtsoligonukleotide für die Gerüstregion 3 humaner V_H Bereiche:	
VH1-FR3	5'-TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA-3'
VH2-FR3	5'-CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA-3'
VH3-FR3	5'-TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC-3'
VH4-FR3	5'-GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAG-3'
VH5-FR3	5'-CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC-3'
VH6-FR3	5'-GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG-3'
VH7-FR3	5'-CAGCACGGCATATCTGCAGATCAG-3'
Rückwärtsoligonukleotid für die Verbindungsregion (J_H)	
FAM JH-con	5'-FAM-CTTACCTGAGGAGACGGTGACC-3'

VIII.4. Gesicherte variable Bereiche humaner Antikörper

Die folgenden Tabellen fassen die variablen Bereiche der schweren und leichten Ketten jener humanen Antikörper zusammen, die mithilfe des erweiterten TILLER Primersatzes (TILLER *et al.*, 2008) aus EBV-transformierten B Zellen gesichert wurden.

Tabelle 21: Zusammenfassung der V_H -Bereiche aus lymphoblastoiden Zellen der in Maastricht durchgeführten Transformation (August 2011). Die Sicherung erfolgte wie unter Abschnitt II.2.3.3. beschrieben. Die Analyse erfolgte mithilfe des V Quest Werkzeugs (www.imgt.org). Die Tabelle gibt, sofern möglich, außerdem Auskunft über den Isotyp der Antikörper. Diese Information geht bei der Durchführung der verschachtelten PCR mit V- und J_H -spezifischen Oligonukleotiden verloren. Die Keimbahnhomologie bezieht sich auf den dem V Gensegment entsprechenden Bereich.

Kultur	Schwere Ketten					
	C_H	V_H	Gensegmente			Keimbahn- homologie
			V	D	J	
1/C3	IgM	3	IGHV3-23*01 F oder IGHV3-23D*01 F	IGHD5-18*01 F	IGHJ6*03 F	100%
	?	4	IGHV4-39*01 F	IGHD2-15*01 F	IGHV4-39*01 F	100%
4/D2	?	3	IGHV3-9*01 F	IGHD3-10*01 F	IGHJ4*02 F	99%
	?	4	IGHV4-59*03 F	IGHD3-16*01 F	IGHJ6*02 F	93%
	?	1	IGHV1-3*01 F	(kein Resultat)	IGHJ3*02 F	98%
	?	3	IGHV3-23*04 F	IGHD5-18*01 F	IGHJ6*03 F	99%
5/E8	IgG	4	IGHV4-4*07 F	IGHD3-22*01 F	IGHJ5*01 F oder IGHJ5*02 F	83%
5/F6	IgG	3	IGHV3-23*04 F	IGHD3-22*01	IGHJ4*02 F	87%
7/D5	?	4	IGHV4-4*07 F	IGHD3-10*01 F	IGHJ6*02 F	100%

Tabelle 22: Zusammenfassung der V_K - und V_L -Bereiche aus lymphoblastoiden Zellen der in Maastricht durchgeführten Transformation (August 2011). Die Sicherung erfolgte wie unter Abschnitt II.2.3.3. beschrieben. Die Analyse erfolgte mithilfe des V Quest Werkzeugs (www.imgt.org). Die Keimbahnhomologie bezieht sich auf den dem V Gensegment entsprechenden Bereich.

Kultur	Leichte Ketten				
	V_L	Gensegmente		Keimbahn- homologie	
		V	J		
1/C3	V_K 2	IGKV2-28*01 F oder IGKV2D-28*01 F		IGKJ4*01 F	99%
	V_L 7	IGLV7-43*01 F		IGLJ3*02 F	100%
4/D2	V_K 1	IGKV1-5*03 F		IGKJ1*01 F	98%
5/E8	V_K 3	IGKV3-20*01 F		IGKJ1*01 F	87%
5/F6	V_K 3	IGKV3-20*01 F		IGKJ1*01 F	91%
7/D5	V_K 3	IGKV1-5*03 F		IGKJ1*01 F	99%

Tabelle 23: Zusammenfassung der V_H-Bereiche aus lymphoblastoiden Zellen der in Aachen durchgeführten Transformation (August 2012). Die Sicherung erfolgte wie unter Abschnitt II.2.3.3. beschrieben. Die Analyse erfolgte mithilfe des V Quest Werkzeugs (www.imgt.org). Die Tabelle gibt außerdem Auskunft über den Isotyp der Antikörper. Die Keimbahnhomologie bezieht sich auf den dem V Gensegment entsprechenden Bereich.

Kultur	Schwere Ketten					
	C _H	V _H	Gensegmente			Keimbahn- homologie
			V	D	J	
1/D9	IgG	1	IGHV1-69*06 F oder IGHV1-69*09 F	IGHD2-21*01 F	IGHJ3*02 F	85%
1/E4	IgG	4	IGHV4-39*07 F	IGHD3-16*01 F	IGHJ4*02 F	88%
	IgG	3	IGHV3-74*01 F oder IGHV3-74*03 F	IGHD3-16*01 F	IGHJ4*02 F	95%
2/D6	IgG	4	IGHV4-39*01 F	IGHD6-19*01 F	IGHJ4*02 F	98%
4/C4	IgG	4	IGHV4-30-4*01 F	IGHD3-16*02 F	IGHJ4*02 F	90%
6/F10	IgG	4	IGHV4-39*07 F	IGHD5-12*01 F	IGHJ4*02 F	90%
8/E5	IgM	3	IGHV3-30*02 F	IGHD1-7*01 F	IGHJ4*02 F	100%
11/C10	IgG	3	IGHV3-7*01 F	IGHD5-24*01	IGHJ4*02 F	90%
12/C4	IgA	4	IGHV4-34*01 F	IGHD5-18*01 F	IGHJ6*02 F	100%
12/D7	IgM	3	IGHV3-49*03 F	IGHD2-21*02 F	IGHJ4*02 F	95%
	IgM	1	IGHV1-2*02 F	(kein Resultat)	IGHJ4*02 F	100%
14/E9	IgM	1	IGHV1-18*01 F	IGHD3-22*01 F	IGHJ4*02 F	100%

Tabelle 24: Zusammenfassung der V_{κ} - und V_{λ} -Bereiche aus lymphoblastoiden Zellen der in Aachen durchgeführten Transformation (August 2012). Die Sicherung erfolgte wie unter Abschnitt II.2.3.3. beschrieben. Die Analyse erfolgte mithilfe des V Quest Werkzeugs (www.imgt.org). Die Keimbahnhomologie bezieht sich auf den dem V Gensegment entsprechenden Bereich.

Kultur	Leichte Ketten			
	V_L	Gensegmente		Keimbahn- homologie
		V	J	
1/E4	$V_{\kappa}1$	IKV1-5*03 F	IKJ3*01 F	97%
	$V_{\kappa}2$	IKV2-28*01 F oder IKV2D-28*01F	IKJ2*01 F	98%
	$V_{\lambda}3$	IGLV3-25*03 F	IGLJ2*01 F	89%
4/C4	$V_{\kappa}1$	IKV1-39*01 F oder IKV1D-39*01 F	IKJ4*01 F	89%
	$V_{\kappa}1$	IKV1D-8*01 F	IKJ3*01 F	90%
	$V_{\lambda}2$	IGLV2-23*02	IGLJ1*01 F	93%
6/F10	$V_{\kappa}3$	IKV3-20*01 F	IKJ1*01 F	96%
	$V_{\kappa}4$	IKV4-1*01 F	IKJ1*01 F	94%
11/C10	$V_{\kappa}1$	IGKV1-5*03 F	IGKJ4*01 F	89%
	$V_{\kappa}2$	IGKV2-28*01 F oder IGKV2D-28*01 F	IGKJ1*01 F	93%
	$V_{\kappa}3$	IGKV3-20*01 F	IGKJ1*01 F	89%
	$V_{\kappa}3$	IGKV3-20*01 F	IGKJ1*01 F	93%
	$V_{\kappa}3$	IGKV3-20*01 F	IGKJ1*01 F	93%
	$V_{\kappa}1$	IGKV1-39*01 F oder IGKV1D-39*01 F	IGKJ2*01 F	82%
	$V_{\kappa}2$	IGKV2-28*01 F oder IGKV2D-28*01 F	IGKJ4*01 F oder IGKJ4*02 F	93%
	$V_{\kappa}3$	IGKV3-15*01 F	IGKJ5*01 F	93%
	$V_{\kappa}4$	IGKV4-1*01 F	IGKJ4*01 F	94%
	$V_{\kappa}4$	IGKV4-1*01 F	IGKJ3*01 F	97%

VIII.5. Vergleich der affinitätsgereiften Antikörper mit ihren nicht mutierten Vorläufern: zusätzliche Information der kodierenden Sequenzen

VH.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTAAAGCCGGGGGGTCCCTGAGGCTC	60
VH.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC ** *****	60
VH.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	TCCTGTGTGGTCTCTGGATTGAGAATTTCCACCTCAGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGTT	120
VH.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGCCAGGCT ***** * ***** ** ** *	120
VH.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	CCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCTCAGATATTAGTGAGAGTGGAGGTAGTAAGGACTAC	180
VH.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	CCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGGTAGCACATACTAC ***** ***** ***** ** *	180
VH.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	GCAGACTCCGTGAGGGGCCGCTTACCATTTCAGAGACACTTCCAAGAACACTTTAT	240
VH.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT ***** * ***** ***** ***** ***** * ** *	240
VH.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	CTGCAAAATGAACAGCCTGGGGCCGACGACACGGCCCTTTATTACTGCGGAAATCCGTG	300
VH.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	CTGCAAAATGAACAGCCTGGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAANNNNN ***** * ***** * ***** * *****	300
VH.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	GGCTACTTTGATACTTCTGGTTATTACAGATGGGACTACTTTGACTCTGGGGCCAGGGA	360
VH.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	NNNACTATGATAGTAGTGGTTATTACNNNNNACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGA ***** * ***** ***** ***** *****	360
Vk.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	GAAATTGTGTGACGAGTCTCCAGACACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAGACTGCCACC	60
Vk.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	GAAATTGTGTGACGAGTCTCCAGGACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC ***** ***** ***** ***** *****	60
Vk.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	CTCTCCTGCAGGGCCAGTCCAGACTGTAGAAGGAACTCCTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA	120
Vk.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	CTCTCCTGCAGGGCCAGTCCAGACTGTAGAAGGAACTCCTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA ***** ***** ** * ** *	120
Vk.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	CCTGGCCAGGCTCCAGACTCCTCATTATGGTGCATCCGACAGGGCCACTGGCATCCCA	180
Vk.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA ***** ***** ***** ***** *****	180
Vk.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGTTTTGGGACAGACTTCACTCTCACCGTGAGCGGACTGGAG	240
Vk.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG ***** * ***** ***** ***** *****	240
Vk.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	CCTGAAGATTTGCAGTATATTACTGTCAGCAGTACGGTACTTCTCCTCGGACATTTCGGC	300
Vk.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	CCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCGGACGTTTCGGC ***** ***** ***** ** *	300
Vk.humAb10.2 (5/F6)_affinitätsgereift	CAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC	325
Vk.humAb10.2 (5/F6)_nicht_affinitätsgereift	CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC	325
	***** *****	

Abbildung 32: Vergleiche der DNS-Sequenzen der V_H - und V_K -Bereiche des Antikörpers humAb10.2 und jenen seines nicht affinitätsgereiften Vorläufers. Die Sequenz der nicht mutierten variablen Bereiche wurden basierend auf der V Quest Analyse (www.imgt.org) bestimmt. Sofern die Nukleotide nicht eindeutig bestimmt werden konnten, wurden entsprechende Abschnitte durch konsequente ‚N‘ ersetzt. Bereiche, die den CDRs entsprechen, sind mit blauen Pfeilen kenntlich gemacht. ‚*‘: identische Nukleotide. Die Vergleiche wurden mithilfe von Clustal Omega durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk>).

VH.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGACCAGGCCTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTTTCTC	60
VH.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTTCCCTC *****	60
VH.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	ACCTGCAGCGTCTCTCTTAGGTCATGAGTGATTACTATTGGAGTTGGGTCCGGCAGCCC	120
VH.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	ACCTGCAGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCC *****	120
VH.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	GCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGCGGATCACCGCCCTGGGACCACCAACTACAAC	180
VH.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	GCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGCGTATCTATACCAGTGGGAGCACCACACTACAAC *****	180
VH.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	CTCAAGTCAACAATCGACTCTCCATGTCCGTGGACACATCCAGGAATCTGTCTCTCTG	240
VH.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	CCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCCAGTAGACACGTCCAAGAACCCAGTTCTCCCTG * * * * *	240
VH.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	AGACTGACCTCTGTGACCGCCGGGACACGGCCGTCTATTATTGACCAGAGATGCACAT	300
VH.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGGGACACGGCCGTCTATTACTGTCCGAGAGANNNNNN * * * * *	300
VH.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	AATTATGGCAGGGGTCTCGACTATTGGGGCCAGGAAAGCTGGTCCCGTCTCCTCAG	358
VH.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	NATGATAGTAGTGGTNTCGACTCTGGGGCCAAGAACCCCTGGTCCCGTCTCCTCAG * * * * *	358
Vk.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	GAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGACATACTGTCTTTGTCTCCGGGGGAAAGAGCCACC	60
Vk.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	GAAATTGTGTGACGACAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC *****	60
Vk.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	CTCTCCTGCAGGGCCAGTCCAGGCTCTCACGCCAAGTATCTCGCCTGGTACCAGCAGAAA	120
Vk.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	CTCTCCTGCAGGGCCAGTCCAGGCTCTCACGCCAAGTATCTCGCCTGGTACCAGCAGAAA *****	120
Vk.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	CCTGCCAGGTTCCCGACTCCTCATCTATGGTTCGTCCACCAGGGCCACTGGCATCCCA	180
Vk.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	CCTGCCAGGCTCCCGACTCCTCATCTATGGTTCGTCCACCAGGGCCACTGGCATCCCA *****	180
Vk.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	GACAGGTCAGAGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTTCACCTAACCATCAGTAGACTGGAG	240
Vk.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	GACAGGTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGACTGGAG *****	240
Vk.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	CCTGCAGACTCTGCAGTATATTACTGTCAACAATATGAAGACTCACCGTGGACATTCGGC	300
Vk.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	CCTGAAGATTTTCAGTGTATTACTGTCCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGGACGTTTCGGC *****	300
Vk.humAb10.3(5/E8)_affinitätsgerieft	CAAGGGACCAAGGTGGAGCTCAAAC	325
Vk.humAb10.3(5/E8)_nicht_affinitätsgerieft	CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC	325

Abbildung 33: Vergleiche der DNS-Sequenzen der V_H und V_K -Bereiche des Antikörpers humAb10.3 und jenen seines nicht affinitätsgerieften Vorläufers. Die Sequenz der nicht mutierten variablen Bereiche wurden basierend auf der V Quest Analyse (www.imgt.org) bestimmt. Sofern die Nukleotide nicht eindeutig bestimmt werden konnten, wurden entsprechende Abschnitte durch konsequente ‚N‘ ersetzt. Bereiche, die den CDRs entsprechen, sind mit blauen Pfeilen kenntlich gemacht. ‚*‘: identische Nukleotide. Die Vergleiche wurden mithilfe von Clustal Omega durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk>).

VH.humAbAMA1_affinitätsgerieift	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTC	60
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTC *** *****	60
VH.humAbAMA1_affinitätsgerieift	ACCTGCTCTGTCTCTGGTGTCTCCGTCAGTAGTACTGTGTCTACTGGGGCTGGATCCGC	120
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	ACCTGCACCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGC *****	120
VH.humAbAMA1_affinitätsgerieift	CAGTCCCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTGGTAGCACGTAC	180
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	CAGCCCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTGGGAGCACCTAC *** *****	180
VH.humAbAMA1_affinitätsgerieift	TACAATGAGGCCCTCAAGAGCCGACTCACCTTGTTCAGTGGAGACGTCGGAGAGGCAGTTC	240
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCTCAAGAACAGTTC *****	240
VH.humAbAMA1_affinitätsgerieift	TCCCTGAGGCTGAGTCTGTGACCCGCGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGGAGAGG	300
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	TCCCTGAAGCTGAGTCTGTGACCCGCGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGGAGAGAN *****	300
VH.humAbAMA1_affinitätsgerieift	GCGATTAATTTTGGGGATATTTCGGGCCCGGGACCTTCTATTTTGACATTTGGGGCCAG	360
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	NNGATTAATTTTGGGGANNN *****	360
VH.humAbAMA1_affinitätsgerieift	GGAACCCGTGATCACCGTCTCCTCA	384
VH.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	GGAACCCGGTCCCGTCTCCTCA *****	384
Vk.humAbAMA1_affinitätsgerieift	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC	60
Vk.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC *****	60
Vk.humAbAMA1_affinitätsgerieift	ATCACTTGCCGGGCCAGTCAAGTATTACTACCTGGTTGGCCCTGGTATCAGCAGAAACCA	120
Vk.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	ATCACTTGCCGGGCCAGTCAAGTATTAGTAGTGGTTGGCCCTGGTATCAGCAGAAACCA *****	120
Vk.humAbAMA1_affinitätsgerieift	GGGACAGCCCTAAACTCCTGATCTATAAGGCGTCTATTTTAGAGACTGGGGTCCCATCA	180
Vk.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCA *****	180
Vk.humAbAMA1_affinitätsgerieift	AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT	240
Vk.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT *****	240
Vk.humAbAMA1_affinitätsgerieift	GATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAGTACTACCTATTTCACCTTTCGGCCCT	300
Vk.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	GATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTTTTCACCTTTCGGCCCT *****	300
Vk.humAbAMA1_affinitätsgerieift	GGGACCAAAGTGGATA	316
Vk.humAbAMA1_nicht_affinitätsgerieift	GGGACCAAAGTGGATA *****	316

Abbildung 34: Vergleiche der DNS-Sequenzen der V_H - und V_K -Bereiche des Antikörpers humAbAMA1 und jenen seines nicht affinitätsgerieften Vorläufers. Die Sequenz der nicht mutierten variablen Bereiche wurden basierend auf der V Quest Analyse (www.imgt.org) bestimmt. Sofern die Nukleotide nicht eindeutig bestimmt werden konnten, wurden entsprechende Abschnitte durch konsequente ‚N‘ ersetzt. Bereiche, die den CDRs entsprechen, sind mit blauen Pfeilen kenntlich gemacht. ‚*‘, ‚‘‘: identische Nukleotide. Die Vergleiche wurden mithilfe von Clustal Omega durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk>).

VIII.6. Interaktionen und Invasionswege

Tabelle 25: Zusammenfassung einiger *P. falciparum* Proteine und ihrer Interaktionspartner auf menschlichen Erythrozyten. MSP1 und andere GPI-verankerte Proteine sind am initialen Kontakt der Merozoiten mit Erythrozyten beteiligt (GOEL *et al.*, 2003; MITCHELL *et al.*, 2004; GILSON *et al.*, 2006; PERSSON *et al.*, 2008). Interaktionspartner der sekundären Interaktionen sind EBA-175, -140, -181 und PfRh1, -2a, -2b und -4 (PERSSON *et al.*, 2008). Kategorisieren lassen sich diese Wechselwirkungen durch ihre (Un)Empfindlichkeit gegenüber der vorherigen Behandlung der Erythrozyten mit Neuraminidase, welches als Sialinsäureabhängigkeit bzw. -unabhängigkeit gedeutet werden kann. Außerdem können die Rezeptorproteine auf den roten Blutkörperchen gegenüber Trypsin und/ oder Chymotrypsin empfindlich sein. (Diese Eigenschaften sind dieser Tabelle nicht zu entnehmen.) Die Liste der aufgeführten Interaktionspartner ist nicht vollständig; viele Interaktionen sind noch nicht im Detail untersucht worden.

<i>P. falciparum</i> Protein	Rezeptor auf menschlichen Erythrozyten	Sialinsäureabhängigkeit der Interaktion	Literatur
EBA-175 (erythrocyte binding antigen 175)	Glykophorin A	sialinsäureabhängig	DOLAN <i>et al.</i> , 1994
EBA-140 (BABEL, EBP-2)	Glykophorin C/D	sialinsäureabhängig	LOBO <i>et al.</i> , 2003
EBA-181 (JESEBL)	„Rezeptor E“	sialinsäureabhängig	GILBERGER <i>et al.</i> , 2003
PfRh1 (<i>P. falciparum</i> reticulocyte homolog 1, PfNBP1)	Glykophorin B („Rezeptor Y“)	sialinsäureabhängig	TRIGLIA <i>et al.</i> , 2005
EBL-1 (unbekannt)	Glykophorin B „Rezeptor X“	?	LI <i>et al.</i> , 2012
PfRh2b (PfNBP2b), PfRh2a (PfNBP2a)	„Rezeptor Z“	sialinsäureunabhängig	DURASINGH <i>et al.</i> , 2003
PfRh4	Komplementrezeptor 1, CR1	sialinsäureunabhängig	THAM <i>et al.</i> , 2010; 2011
AMA1	„Rezeptor Kx“	sialinsäureunabhängig	KATO <i>et al.</i> , 2005
MSP1	Bande 3	sialinsäureunabhängig	KARIUKI <i>et al.</i> , 2005
PfRh5	Basigin	?	BARTHOLDSON <i>et al.</i> , 2013
PfMTRAP	Semaphorin-7A	?	BARTHOLDSON <i>et al.</i> , 2012; 2013

VIII.7. Abkürzungen

ACT	Artemisinin-based Combination Therapy
ADC	Antibody-Drug Conjugate; Antikörper-Wirkstoff-Konjugate
ADCI	Antibody-Dependent Cellular Inhibition
Akt	Akt Kinase
AMA1	Apical Membrane Antigen 1
Amp; Amp ^R	Ampizillin; Ampizillinresistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APAD	3-Acetylpyridinadenindinukleotid
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäureassay
BCR	B Cell Receptor, B Zellrezeptor
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C-terminal; C-Terminus	carboxyterminal; Carboxyterminus
C-Wert	Kreuzvernetzungsgrad von Polyacrylamidgelen $C [\%] = m_{\text{Bisacrylamid}} [\text{g}] / (m_{\text{Acrylamid}} [\text{g}] + m_{\text{Bisacrylamid}} [\text{g}]) \cdot 100$
Calcein AM	Calceinacetoxymethylester
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate; zyklisches Adenosinmonophosphat
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus; Blumenkohl Mosaik Virus
Carb; Carb ^R	Carbenicillin; Carbenicillinresistenz
CD22	Cluster of Differentiation 22, Oberflächenmarker reifer B Zellen
CD36	Cluster of Differentiation 36, ein Adhäsionsmolekül
cDNS	DNS Kopie, RT-PCR Produkt
CDR	Complementarity Determining Region
CFCA	Calibration-Free Concentration Analysis, Konzentrationsmessung funktionalen Antikörpers ohne Kalibrierung
CID / ETD	Collision-Induced Dissociation / Electron Transfer Dissociation
C _H , C _κ , C _λ	konstante Bereiche schwerer und leichter (κ, λ) Immunglobulinketten
CHO Zellen	Chinese Hamster Ovary Zellen
CIDR	Cysteine-Rich Inter Domain Region
CPDA	Antikoagulan; enthält Zitrat, Phosphat, Dextrose und Adenin
CpG ODN 2006	Oligodeoxynukleotid 2006; ein TLR9-Ligand
CSP	Circumsporozoitenantigen
CSP-TSR	Thrombospondin-like (Type I) Repeat of CSP
Cy3	Carbocyanine 3, Karbozyanin 3
DBL	Duffy binding like domain
dNTP	1:1:1:1 Mischung von Desoxyadenosintriphosphat, Desoxyguanosin-triphosphat, Desoxycytidintriphosphat und Desoxythymidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-64	trans-Epoxy succinyl-L-leucylamino(4-guanidino)butan; ein Cystein-Proteaseinhibitor
EBA-140, -175, -181	Erythrocyte Binding Antigen-140, -175, -181
EBNA	Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EC ₅₀	halbmaximal effektive Konzentration
EDC / NHS	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid / N-Hydroxysuccinimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor; Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
EST	Expressed Sequence Tag
Fab	antigenbindendes Fragment aus V _H , C _H 1, V _L und C _L
FAM	Fluoreszeinamidit

FKS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GIA	Growth Inhibition Assay; Wachstumsinhibitionstest
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus-1
HHV	Humanes Herpesvirus
Hkt	Hämatokrit
HLA	Humanes Leukozytenantigen, MHC
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IFA	Immunofluorescence Assay
IgG, IgA, IgM, IgE	Immunglobuline G, A, M, E
Ig κ , Ig λ	leichte Immunglobulinketten κ und λ
IL-2, IL-6, IL-8	Interleukin-2, -6, -8
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITN	Insecticide-Treated (Bed) Net
Kana; Kana ^R	Kanamycin; Kanamycinresistenz
k_a [L · mol ⁻¹ · sec ⁻¹]	Assoziationskonstante
k_d [sec ⁻¹]	Dissoziationskonstante
K_D [mol · L ⁻¹]	Affinitätskonstante; $K_D = k_d / k_a$
kDa	Kilodalton
LB	Left Border
LB-Medium	Luria-Broth Medium
LCL	Lymphoblastoid Cell Line, lymphoblastoide Zellreihe
LMP1	Latent Membrane Protein 1
M/V	Masse je Volumen
mAb; humAb	monoklonaler Antikörper; humaner monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCM	Malaria Cell Culture Medium
MSP	Merozoitenoberflächenprotein, z.B. MSP1, MSP3, MSP4, MSP8, MSP10
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
N-Glykosylierung	Glykosylierung, die über Stickstoffatome von Asparaginyln- oder Argininylnseitenketten angebracht ist
N-terminal; N-Terminus	aminoterminal; Aminoterminal
NBF	Nitroblau-Formazan
NBT / BCIP	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid / 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
nt	Nukleotid
OD _{600 nm}	optische Dichte bei 600 nm
O-Glykosylierung	Glykosylierung, die über Sauerstoffatome von Serin-, Threonin-, Tyrosin-, Hydroxylysin-, oder Hydroxyprolinseitenketten angebracht ist
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<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. yoelii</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PAA	Polyacrylamid
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells; mononukleäre Lymphozyten des peripheren Bluts
PBS	physiologischer Phosphatpuffer
pCO ₂ , pN ₂ , pO ₂	Kohlendioxid-, Stickstoff- und Sauerstoffpartialdrücke
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PE, RPE	Phycoerythrin, R-Phycoerythrin
PfRh1, -2a, -2b, -3, -4, -5	<i>Plasmodium falciparum</i> Reticulocyte Binding Homolog 1, 2a, 2b, 3, 4, 5
Pfs25	<i>P. falciparum</i> Ookinetenoberflächenantigen (25 kDa)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
pLDH	plasmodiale L-Laktatdehydrogenase, EC 1.1.1.27
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PolyA	Polyadenylierungssequenz
PWM	Pokeweed Mitogen; Lektin der Pflanze <i>Phytolacca americana</i>
<i>R. radiobacter</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)
R10, R20	RPMI 1640 Medium mit 10% (V/V) oder 20 % (V/V) FKS
R10HP	RPMI 1640 Medium mit 10% (V/V) FKS, Hepes- und Pyruvatzusatz, B Zellmedium
Ras	eine GTPase
RB	Right Border
RBK	rote Blutkörperchen
rhIL-2	rekombinant exprimiertes, humanes Interleukin-2
Rif; Rif ^R	Rifampicin; Rifampicinresistenz
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT-PCR	Polymerase Kettenreaktion mit Reverser Transkriptase
RU	Resonance Unit; Resonanzeinheit
SAR	Scaffold Attachment Region
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAA Gel	SDS-Polyacrylamidgel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
SMRV	Squirrel Monkey Retrovirus; Totenkopffäffchen Retrovirus
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPR	Surface Plasmon Resonance, Oberflächenplasmonresonanz
T-Wert	Totale Konzentration von Acrylamid von Polyacrylamidgelen $T [\%] = (m_{\text{Acrylamid}} [\text{g}] + m_{\text{Bisacrylamid}} [\text{g}]) / V [\text{L}] \cdot 100$
T25-, T75-Flasche	Zellkulturflaschen mit Kulturflächen von 25 cm ² oder 75 cm ²
Taq	DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i> ; Nukleotidyltransferase, E.C. 2.7.7.7
T _c Zelle	zytotoxische T Zelle
TCR	T Cell Receptor; T Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T _H Zelle	T Helferzelle
TLR7, -8, -9	Toll-Like Rezeptoren 7, 8, 9
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V/V	Volumen je Volumen
V _H , V _K , V _L	variable Bereiche schwerer und leichter (κ, λ) Immunglobulinketten
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Aminosäurecode

Bei sämtlichen in der vorliegenden Arbeit vorkommenden Aminosäuren handelt es sich um die L-Stereomere.

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Basenpaarcode

A	Adenin	K	T, U oder G
C	Cytosin	W	T, U oder A
G	Guanin	S	C oder G
T	Thymin	B	C, T, U oder G (nicht A)
U	Uracil	D	A, T, U oder G (nicht C)
R	Purin (A oder G)	H	A, T, U oder C (nicht G)
Y	Pyrimidin (C, T oder U)	V	A, C oder G (nicht T oder U)
M	C oder A	N	beliebiges Basenpaar

DNS-Kodons

Kodon	Aminosäure	Kodon	Aminosäure	Kodon	Aminosäure	Kodon	Aminosäure	
GUU	Valin	GCU	Alanin	GAU	Asparaginsäure	GGU	Glycin	
GUC		GCC		GAC		GGC		
GUA		GCA		GAA	Glutaminsäure	GGA		
GUG		GCG		GAG		GGG		
CUU	Leucin	CCU	Prolin	UAU	Tyrosin	UGU	Cystein	
CUC		CCC		UAC		UGC		
CUA		CCA		UAA	(Stopp)	UGA	(Stopp)	
CUG		CCG		UAG		UGG	Tryptophan	
UUA		UCU	AAU	Serin	AGU	Asparagin	AGU	Serin
UUG		UCC	AAC		AGC			
UUU	UCA	AAA	Lysin		AGA	Arginin	AGA	
UUC	UCG	AAG		AGG				
AUU	Isoleucin	ACU		Threonin	CAU		Histidin	CGU
AUC		ACC	CAC		CGC			
AUA		ACA	CAA		Glutamin	CGA		
AUG	Methionin	ACG	CAG	CGG				

Einheiten

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Da	Dalton (g/mol)
g	Gramm
h	Stunde
K	Kelvin
L	Liter
M	molar (mol/L)
min	Minute
sec	Sekunde
U	Einheit einer enzymatischen Aktivität
rpm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
xg	Vielfaches der Erdanziehung, $1 \times g = 9,81 \text{ m/sec}^2$

Vorsätze

exa	E	10^{18}
peta	P	10^{15}
tera	T	10^{12}
giga	G	10^9
mega	M	10^6
kilo	k	10^3
hecto	h	10^2
deca	da	10
deci	d	10^{-1}
centi	c	10^{-2}
milli	m	10^{-3}
micro	μ	10^{-6}
nano	n	10^{-9}
pico	p	10^{-12}
femto	f	10^{-15}
atto	a	10^{-18}

IX. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

IX.1. Tabellen

Tabelle	Seite
Tabelle 1: Zusammenstellung von Puffern und Medien und deren Zusammensetzung.	13
Tabelle 2: Detektionsantikörper für Western Blot und ELISA.	15
Tabelle 3: Fluoreszenzmarkierte Antikörper zur durchflusszytometrischen Sortierung von B Zellen und zur Verwendung in der Immunfluoreszenzmikroskopie.	16
Tabelle 4: Enzyme für molekularbiologische Arbeiten.	16
Tabelle 5: Überblick der verwendeten Baukastensysteme.	17
Tabelle 6: Zusammenstellung des erweiterten Primersets zur Sicherung und Klonierung variabler Bereiche humaner Antikörper.	17
Tabelle 7: Primer zur zielgerichteten Mutagenese von variablen Bereichen humaner Antikörper.	19
Tabelle 8: Primer für Kolonien-PCRs.	19
Tabelle 9: Zusammenstellung von Eigenschaften eukaryotischer Zelllinien.	20
Tabelle 10: Geräteliste.	22
Tabelle 11: Liste der verwendeten Software.	23
Tabelle 12: Zusammenfassung der Medien und Verdünnungsfaktoren für die etablierten Zelllinien.	31
Tabelle 13: Zusammenfassung der Kombinationen schwerer und leichter Ketten der MSP10- oder AMA1-spezifischen humAbs.	49
Tabelle 14: Zusammenfassung der DNS- und Aminosäuremutationen in den Gerüstregionen und CDRs der von humAb10.2, humAb10.3 und humAbAMA1.	51
Tabelle 15: Assoziations-, Dissoziations- und Affinitätskonstanten der MSP10-spezifischen humAbs.	59
Tabelle 16: Zusammenfassung der Kennwerte der Wachstumsinhibition des <i>P. falciparum</i> 3D7 durch humAb10.1, 10.2 und 10.3.	63
Tabelle 17: Inhibition der <i>P. falciparum</i> -Stämme HB3 und Dd2 durch humAb10.1, 10.2 und 10.3.	63
Tabelle 18: EC ₅₀ -Werte des humAbAMA1 bei <i>P. falciparum</i> 3D7, K1, FCR-3, HB3, Dd2 und W2mef.	64
Tabelle 19: Primer aus TILLER <i>et al.</i> (2008), die in der vorliegenden Arbeit zur Sicherung und Klonierung variabler Bereiche humaner Antikörper verwendet wurden.	xii
Tabelle 20: Primer für die Fragmentanalyse.	xiv
Tabelle 21: Zusammenfassung der V _H -Bereiche aus lymphoblastoiden Zellen der in Maastricht durchgeführten Transformation (August 2011).	xv
Tabelle 22: Zusammenfassung der V _K - und V _λ -Bereiche aus lymphoblastoiden Zellen der in Maastricht durchgeführten Transformation (August 2011).	xv
Tabelle 23: Zusammenfassung der V _H -Bereiche aus lymphoblastoiden Zellen der in Aachen durchgeführten Transformation (August 2012).	xvi

Tabelle 24: Zusammenfassung der V_{κ} - und V_{λ} -Bereiche aus lymphoblastoiden Zellen der in Aachen durchgeführten Transformation (August 2012).	xvii
Tabelle 25: Zusammenfassung einiger <i>P. falciparum</i> Proteine und ihrer Interaktionspartner auf menschlichen Erythrozyten.	xxi

IX.2. Abbildungen

Abbildung	Seite
Abbildung 1: Schema des Lebenszyklus des <i>Plasmodium falciparum</i> in Menschen und weiblichen Anophelesmücken.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des PfMSP10 in Anlehnung an TETTEH <i>et al.</i> (2009).	5
Abbildung 3: Modell der Strukturen der EGF-Motive des <i>P. falciparum</i> MSP1 und des <i>P. berghei</i> MSP8 in Anlehnung an DREW <i>et al.</i> (2004).	6
Abbildung 4: Alignment der doppelten EGF-Motive des MSP1, des MSP8 und des MSP10 aus <i>P. falciparum</i> 3D7.	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion von AMA1 und RON2 bei der Invasion eines Merozoiten in ein rotes Blutkörperchen.	8
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Herangehensweise zur Generierung humaner monoklonaler Antikörper gegen <i>Plasmodium falciparum</i> mittels EBV Transformation von antigenspezifischen B Zellen ghanaischer Spender.	11
Abbildung 7: Vektorkarte des Vektors pTRAkt_IgG1_H zur apoplastischen Expression von IgG1 schweren Ketten in <i>N. benthamiana</i> .	20
Abbildung 8: Darstellung der enzymatisch katalysierten Reaktionen zum quantitativen Nachweis der plasmodialen Laktatdehydrogenase.	35
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Strategie der verschachtelten PCRs zur Sicherung der variablen Sequenzen humaner Antikörper aus lymphoblastoiden Zellreihen.	37
Abbildung 10: Untersuchung der Bildung von Zellaggregaten und der Sekretion humanen IgGs von lymphoblastoiden Zellen in Abhängigkeit unterschiedlichen Mediums und der Anwesenheit der Zusätze CpG ODN 2006 und humanen holo-Transferrins.	43
Abbildung 11: Transformationseffizienz und Antikörpersekretion frischer B Lymphozyten in Abhängigkeit unterschiedlicher Versorgerzellen und CpG ODN 2006.	44
Abbildung 12: Elektropherogramme der Fragmentanalyse der Kulturen 5/F6 und 5/E8.	46
Abbildung 13: ELISA testweise exprimierter humAbs und Dotplot der Rohextrakte.	48
Abbildung 14: Vergleiche der Aminosäuresequenzen der V_{H-} und V_{κ} -Bereiche der Antikörper humAb10.2, humAb10.3 und humAbAMA1 mit ihren jeweiligen nicht affinitätsgereiften Vorläufern.	50

Abbildung 15: Chromatogramm einer repräsentativen Reinigung humaner Antikörper über Protein-A.	51
Abbildung 16: Coomassie-gefärbte SDS-PAA Gele und Western Blots nicht reduzierter und reduzierter Fraktionen aufgearbeiteter <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen und der Protein-A-Chromatographie.	52
Abbildung 17: Analytische Gelfiltration zur Bestimmung der Zusammensetzung der aus <i>N. benthamiana</i> gereinigten Antikörper.	52
Abbildung 18: Coomassie-gefärbte SDS-PAA Gele und Western Blots nicht reduzierter und reduzierter Fraktionen der Protein-A-Chromatographie lymphoblastoider Zellkulturüberstände.	53
Abbildung 19: Dotplot und ELISA zur Spezifitätsbestimmung der MSP10-spezifischen humAbs.	54
Abbildung 20: ELISA zur Bestimmung der konformationellen Abhängigkeit der AMA1:humAbAMA1-Interaktion.	55
Abbildung 21: Reaktivität der ghanaischen Seren der Spender 0001-00031 gegen die EGF-Motive des PfMSP10.	56
Abbildung 22: Reaktivität der ghanaischen Seren der Spender 0001-00031 gegen AMA1 3D7.	57
Abbildung 23: Indirekte konfokale Fluoreszenzmikroskopie von <i>P. falciparum</i> 3D7 Schizonten und Merozoiten.	58
Abbildung 24: Oberflächenplasmonresonanzmessungen mit humAbAMA1 und AMA1 3D7, FCR-3, HB3 und DiCo 1, 2 und 3.	60
Abbildung 25: Kompetitionsmessungen mit AMA1 3D7, humAbAMA1, mAb1F9 und mAb4G2.	61
Abbildung 26: Kompetitionsmessung mit AMA1 3D7, RON2sp1 Peptid und humAbAMA1.	61
Abbildung 27: Wachstumsinhibitionstest rekombinant exprimierter MSP10-spezifischer humAbs mit <i>P. falciparum</i> 3D7.	62
Abbildung 28: Wachstumsinhibition der <i>P. falciparum</i> Stämme 3D7, K1 und W2mef durch humAbAMA1.	64
Abbildung 29: 50%-Isobologramm der Inhibition des <i>P. falciparum</i> -Stamms 3D7 durch Kombination von humAb10.1 und humAbAMA1.	65
Abbildung 30: Vergleiche verschiedener <i>P. falciparum</i> AMA1-Sequenzen.	66
Abbildung 31: Grafische Darstellung der relativen Transkriptionslevel von <i>P. falciparum</i> AMA1, MSP1 und MSP10 während der 48 Stunden eines asexuellen Entwicklungszyklus im Blut.	xi
Abbildung 32: Vergleiche der DNS-Sequenzen der V _H - und V _K -Bereiche des Antikörpers humAb10.2 und jenen seines nicht affinitätsgereiften Vorläufers.	xviii
Abbildung 33: Vergleiche der DNS-Sequenzen der V _H und V _K -Bereiche des Antikörpers humAb10.3 und jenen seines nicht affinitätsgereiften Vorläufers.	xix
Abbildung 34: Vergleiche der DNS-Sequenzen der V _H - und V _K -Bereiche des Antikörpers humAbAMA1 und jenen seines nicht affinitätsgereiften Vorläufers.	xx

Veröffentlichungen und Patente

Patentanmeldungen

“Novel anti-Plasmodium-Parasite Antibodies.”

Rainer Fischer, Stefan Barth, Rolf Fendel, Torsten Klockenbring, Dominika Maskus,
Stephanie Kapelski und Andreas Reimann
Patentanmeldung WO2013EP66086

“Anti-Plasmodium Parasite Antibodies.”

Rainer Fischer, Stefan Barth, Rolf Fendel, Torsten Klockenbring, Dominika Maskus und
Andreas Reimann
Patentanmeldung. Eingereicht: April 2015.

Veröffentlichungen

“Efficient antibody rescue from antigen-specific human B lymphocytes following Epstein-Barr Virus-transformation.”

Dominika J. Maskus, Susanne Bethke, Alexander Boes, Holger Spiegel, Torsten
Klockenbring, Rainer Fischer, Stefan Barth und Rolf Fendel
2013, Poster, Malaria Meeting der Paul Ehrlich Gesellschaft, Aachen 2013 (Konferenz)

“Recombinant human anti-malarial monoclonal antibodies – a technology platform.“

Rolf Fendel, Dominika J. Maskus, Stephanie Kapelski, Melanie Seidel, Otchere Addai-
Mensah, Andreas Reimann, Rainer Fischer, Torsten Klockenbring und Stefan Barth
2013, Vortrag, Malaria Meeting der Paul Ehrlich Gesellschaft, Aachen 2013 (Konferenz)

“Optimization of a multi-stage, multi-subunit malaria vaccine candidate production in *Komagataella (Pichia) pastoris* by the identification and removal of protease cleavage sites.”

Holger Spiegel, Helga Schinkel, Robin Kastilan, Pia Dahm, Alexander Boes, Matthias
Scheuermayer, Ivana Chudobová, Dominika Maskus, Rolf Fendel, Stefan Schillberg, Gabriele
Pradel, Andreas Reimann und Rainer Fischer
Journal: *Biotechnology and Bioengineering*. Akzeptiert im Oktober 2014.

“Human monoclonal antibodies directed at *Plasmodium falciparum* MSP10.“

Dominika J. Maskus, Susanne Bethke, Otchere Addai-Mensah, Stephanie Kapelski,
Alexander Boes, Véronique Beiss, Holger Spiegel, Carmen Franken, Andreas Reimann,
Rainer Fischer, Stefan Barth, Torsten Klockenbring und Rolf Fendel
Journal: *Malaria Journal*. Eingereicht: Januar 2015.

Lebenslauf

- 2002 : Allgemeine Hochschulreife
- 2002-2004 : Grundstudium in Biologie, RWTH Aachen
- 2004-2009 : Hauptstudium in Biologie und Biochemie an der RWTH Aachen und an der
Universität Claude Bernard, Lyon, Frankreich
- 2009-2010 : **Diplomarbeit** am Fraunhofer IME, Aachen
bei Herrn Prof. Rainer Fischer und Herrn Prof. Stefan Barth
„Isolation *Plasmodium falciparum* MSP1-spezifischer Antikörper.“
- 2010-2012 : Zusatzstudium in Wirtschaftswissenschaften, RWTH Aachen
- 2012 : **Diplomarbeit** am Lehrstuhl für Organisation, RWTH Aachen
bei Frau Prof. Christine Harbring
„Neigung zur Nichthandlung: Literaturanalyse und
Implementierungsvorschläge für die experimentelle Wirtschaftsforschung.“
- 2011-2014 : Stipendiatin der Jürgen Manchot Stiftung
- 2010-2015 : **Promotion** am Fraunhofer IME, Aachen
bei Herrn Prof. Rainer Fischer und Herrn Prof. Stefan Barth
„Generierung *Plasmodium falciparum*-spezifischer humaner Antikörper-
formate aus Epstein-Barr Virus-transformierten B Lymphozyten semi-immuner
Individuen.“

Danksagung

- ▶ Herrn Prof. Dr. Rainer Fischer und Herrn Prof. Dr. Dr. Prof. Stefan Barth möchte ich herzlich danken für die Betreuung und die Möglichkeit meine Diplomarbeit und meine Doktorarbeit am Fraunhofer IME in Aachen anfertigen und während der Doktorarbeit mein Zusatzstudium weiterverfolgen und abschließen zu können.
- ▶ Herrn Prof. Dr. Lothar Elling danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.
- ▶ Der Jürgen Manchot Stiftung danke ich für die jahrelange finanzielle Unterstützung. Ohne sie wären mein Zusatzstudium und die Doktorarbeit undenkbar gewesen. Ich bedanke mich außerdem herzlich für den großzügigen Zuschuss für meine Teilnahme an der Konferenz „Malaria Vaccines for the World“ in Lausanne im April 2013.
- ▶ Rolf Fendel und Torsten Klockenbring gebührt mein Dank für die Betreuung, ihre konstruktiven Vorschläge, das Vertrauen, den Freiraum und die Geduld.
- ▶ Stefano DiFiore danke ich für die Unterstützung beim Hochdurchsatzscreening der EBV Transformationsbedingungen, die Einblicke in die automatisierte konfokale Fluoreszenzmikroskopie und die Auswertung des Bildmaterials.
- ▶ Ohne Mario Losen, Kathleen Vrolix und Jozien Jaspers-Spits (Universität Maastricht, Maastricht, Niederlande) wäre die erste EBV Transformation mit antigenspezifischen B Zellen nicht möglich gewesen. Ich danke Euch ganz herzlich dafür.
- ▶ Den Antikörperexperten Holger Spiegel und Markus Sack danke ich für die zahlreichen SPR-Messungen und -Auswertungen – und für den Tipp der Tyrosinsulfatylierung.
- ▶ Jürgen Drossard, Nicole Raven, Helga Schinkel und Natalie Koch, Alexander Boes, Robin Kastilan und Thomas Rademacher danke ich für die unspezifischen Kontrollen für pflanzenexprimierte humAbs (2G12 und M12), rekombinante Proteine (MSP3, Pf38, E25T, mE25T, PIMP) bzw. *N. benthamiana*-Pflanzen. Ed Remarque (BPRC, Rijswijk, Niederlande) ist zu danken für das polyklonale AMA1-spezifische IgG aus Kaninchen (BG98) und die AMA1 Varianten HB3 und FCR-3.
- ▶ Carmen Franken und Nicole Kündgen-Redding; ich danke Euch für die unermüdliche Unterstützung beim Sammeln der Überstände der lymphoblastoiden Zellen.
- ▶ Bei Reinigungen rekombinanter Proteine war auf Reinhard Rosinke, Stefan Rasche und Alex Boes immer Verlass!
- ▶ Mein Dank gilt außerdem den ghanaischen und madagassischen Spendern, die mit ihrem Geschenk, ihrem Blut, ihren Beitrag zur Malariaforschung und zu meiner Arbeit geleistet haben. Für die Organisation und Unterstützung in Ghana und Madagaskar ist außerdem Margaret Frempong, Otchere Addai-Mensah in Ghana und Prof. Raphaël Rakotozandrindrainy, Maminirina Razafimahefa, Jean Louis Razafindrakoto, Valisoa Jocelyn Ramanambahy (CHU d'Andova, Mahajanga), Francine Rasoafaralalao und Pascal Rakotozanany (Centre de Santé de Base, Mahajanga) in Madagaskar zu danken.

- ▶ Susanne Bethke, Melanie Seidel und Michael Krolik unterstützten mich bei der Klonierungsarbeiten und der Identifikation vielversprechender rekombinanter anti-plasmodialer Antikörper. Maïke Baues danke ich für ihre Arbeit mit Nanopartikeln zur Malariadiagnostik und die damit verbundenen Einblicke und Horizonterweiterungen. Es hat mir sehr viel Freude bereitet Euch zu betreuen und mit Euch zu arbeiten.
- ▶ Claudia Kessler, Gudrun Breuer und Carmen Franken danke ich für die tollen Gespräche – und ihren Humor.
- ▶ Meinen Großeltern mütterlicherseits, meinem Bruder, meinem Freund und seiner Familie möchte ich ebenfalls herzlich danken für ihre Unterstützung, ihr offenes Ohr und die konstruktiven Gespräche.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften anderer entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht als Prüfungsarbeit eingereicht worden.

Aachen, im Januar 2015

Dominika Maskus

