

Aus dem Institut für Virologie
Direktor des Instituts: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin – FB20 der Philipps-Universität Marburg

UNTERSUCHUNGEN ZUR O-GLCNAc MODIFIKATION VON
PLASMODIUM FALCIPARUM DEM ERREGER DER MALARIA TROPICA

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

MATTIS KUPFERSCHMID
aus Ulm

Marburg
März 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
20. September 2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner
Referent: Prof. Dr. Ralph T. Schwarz
1. Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Visekruna

Mattis Kupferschmid: *Untersuchungen zur O-GlcNAc Modifikation von Plasmodium falciparum dem Erreger der Malaria tropica, März 2021*

PREGUNTANDO CAMINAMOS



Altes philosophisches Konzept der indigenen Gruppen im heutigen Chiapas,
Mexico

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund Malaria tropica ist global gesehen eine der tödlichsten Infektionskrankheiten. In einem historischen Kraftakt gelang es, die durch den Parasiten *Plasmodium falciparum* ausgelöste und über Mosquitos übertragene Krankheit einzudämmen und in vielen Ländern vollständig zu eradizieren. Dieses Ziel global zu erreichen, scheint jedoch noch in weiter Ferne. Vor allen in den tropischen Regionen Afrikas versterben jährlich weiterhin mehrere hunderttausend Menschen, vor allem Säuglinge und Kinder, an der Krankheit.

Posttranslationale Modifikationen (PTMs) bilden eine große Gruppe biochemischer Veränderungen, welche die Komplexität von Proteomen aller Lebewesen erhöhen. PTMs wurden aufgrund ihrer Beteiligung an verschiedensten Zellprozessen bereits mehrfach als Ziel potentieller Malaria-Therapeutika diskutiert. O-GlcNAcylierung ist eine bei vielen Organismen verbreitete PTM. Diese spezielle Form der Glykosylierung ist aufgrund der Beteiligung an verschiedenen Pathologien wie neurodegenerativen Erkrankungen und Neoplasien in den Fokus gerückt. Sie spielt jedoch auch eine wichtige regulative Rolle im zellulären Energiestoffwechsel. Auch bei *P. falciparum* ist ihr allgemeines Vorkommen bereits bekannt. Ziel dieser Arbeit war es zu identifizieren, welche Proteine im Proteom des Parasiten O-GlcNAc modifiziert sind, mehr über den Prozess dieser Modifikation herauszufinden und eventuelle Funktionen bei Apikomplexa generell nachvollziehen zu können.

Methoden Der *P. falciparum* Stamm 3D7 wurde in Erythrozytenkulturen angezüchtet und vermehrt. Das Proteom wurde auf O-GlcNAcylierung untersucht, hierbei wurden unterschiedliche Nachweismethoden angewandt. Das Niveau der UDP-GlcNAc-Konzentration, dem Donor der O-GlcNAc-Modifikation, wurde in der *high performance Anion Exchange Chromatography*] (HPAEC) gemessen. O-GlcNAcylierte Proteine wurden nach *click-chemistry*-Biotinmarkierung und mit Weizenkeimlektin-Agaroseperlen angereichert. Die Identifizierung der modifizierten Proteine erfolgte in der Massenspektrometrie (nano-LC MS/MS).

Ergebnisse *P. falciparum* verfügt über einen eigenen, wenn auch im Vergleich zu MRC-5 Kontrollzellen sehr niedrigen, UDP-GlcNAc-Vorrat. In der Immundetektion stellen sich Unterschiede der O-GlcNAcylierung der verschiedenen Parasitenstadien dar. Durch verschiedene proteomische Techniken konnten im Proteom von reifen Trophozoiten 14 O-GlcNAcylierte Proteine eindeutig identifiziert werden (11 über *click-chemistry*, 6 über sWGA-Perlen Anreicherung und eine durch spezifische Antikörper). Diese Proteine sind an für das Überleben des Parasiten wichtigen, Funktionen, Strukturen und Stoffwechselwegen beteiligt. Vier der identifizierten Proteine sind Enzyme der Glykolyse. Diese ist von großer Bedeutung für den Energiestoffwechsel des Parasiten. Durch Inkubation *click-chemistry*-modifizierter Proteine mit

spezifischen Antikörpern konnte die O-GlcNAcylierung der Proteine Hsp70 und α -Tubulin zusätzlich zur Massenspektroskopie immunbiochemisch gezeigt werden. Die Inkubation von *P. falciparum*-Kulturen mit einem Inhibitor der O-GlcNAc-Abspaltung führte zu einer nicht signifikanten Abnahme der Wachstumsrate

Schlussfolgerungen In dieser Studie konnten zum ersten Mal O-GlcNAcylierte Proteine im Proteom von *P. falciparum* nachgewiesen und benannt werden. Auch wenn einige Parallelen zum O-GlcNAcom anderer Organismen bestehen, lassen strukturelle Unterschiede doch die Möglichkeit erscheinen, diese Strukturen als mögliche Ziele einer Malariatherapie in Angriff zu nehmen. Die Blockierung der UDP-GlcNAc Biosynthese oder der Abspaltung von O-GlcNAc von bereits modifizierten Proteinen könnten andere vielversprechende Ansätze darstellen, um den Lebenszyklus von *P. falciparum* zu hemmen. Zudem können das Auftreten der post-translationalen Modifikation bei *P. falciparum* sowie die Unterschiede im Vergleich zu anderen Spezies Hinweise bezüglich der taxonomischen Einordnung der Apicomplexa bieten.

SUMMARY

Background Despite the huge and in parts very successful global effort to eradicate malaria tropica, it still is one of the most deadly infectious diseases. Therefore *Plasmodium falciparum* the disease causing parasite is a major target of medical research. Post-translational modifications (PTMs) constitute a huge group of chemical modifications that increase the complexity of the proteomes of living beings. PTMs have been discussed as potential anti-malarial drug targets due to their involvement in many cell processes. O-GlcNAcylation is a widespread PTM found in different organisms including *P. falciparum*. The aim of this study was to identify O-GlcNAcylated proteins of *P. falciparum*, to learn more about such modification process and to predict its possible functional role in the Apicomplexans.

Methods The *P. falciparum* strain 3D7 was cultivated in erythrocytes, purified and the proteome checked for the O-GlcNAc-modification by using different methods. The level of UDP-GlcNAc, the donor of the sugar moiety for O-GlcNAcylation processes, was measured using high performance anion exchange chromatography (HPAEC). O-GlcNAcylated proteins were enriched and purified utilizing either click chemistry labelling or adsorption on succinyl-wheat germ agglutinin beads. Proteins were then identified by mass-spectrometry (nano-LC MS/MS).

Results While low, when compared to MRC-5 control cells, *P. falciparum* possesses its own pool of UDP-GlcNAc. By using proteomics methods, 13 O-GlcNAcylated proteins were unambiguously identified in late trophozoites (11 by click-chemistry and 6 by sWGA-beads enrichment; 4 being identified by the two approaches). These proteins are all part of pathways, functions and structures important for the parasite survival. By probing „clicked“ proteins using specific antibodies the heat shock protein (Hsp)70 and alpha-tubulin were identified as *P. falciparum* O-GlcNAc-bearing proteins. Cultivation of *P. falciparum* in presence of an inhibitor for the O-GlcNAc catalysis reduced the parasite growth. However the interaction effect was not significant.

Conclusions This is the first study exploring the O-GlcNAcylated proteins in *P. falciparum*. While the parasite O-GlcNAcome seems to be close to those of other species, the structural differences exhibited by the proteomes provides a glimpse of innovative therapeutic paths to fight malaria. Blocking biosynthesis of UDP-GlcNAc or inhibiting the O-GlcNAc catalysis could be other promising options to inhibit the life cycle of *Plasmodium*. The existence of O-GlcNAcylation in *P. falciparum* and therefore in Apicomplexa in general could help to unravel the phylum's difficult taxonomic classification.

PUBLIKATIONEN

Ein Teil der in dieser Dissertation aufgeführten Ergebnisse, ist bereits in folgenden Publikationen und Präsentationen veröffentlicht worden:

Posterpräsentation:

Mattis Kupferschmid, Moyira Osny Aquino Gil *et al.*

„Characterization of O-GlcNAcylation in the apicomplexans *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*“

Biochemical society Hot Topic Event: Protein O-GlcNAcylation in Health and Disease, 08.07.2016 – London, *United Kingdom*/Vereinigtes Königreich (UK)

([Abschnitt .1](#))

Konferenzbeitrag und Posterpräsentation:

Mattis Kupferschmid, Moyira Osny Aquino Gil *et al.*

„Identification of O-GlcNAcylated proteins in the apicomplexans *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*“

27TH Joint Glycobiology Meeting, 16–18.10.2016 – Nijmegen, Niederlande

([Abschnitt .2](#), [Abschnitt .3](#))

Publikation als Erstautor:

Mattis Kupferschmid, Moyira Osny Aquino Gil *et al.*

„Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*.“

In: *Malaria journal* 16.1 (2017), S. 485.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2131-2> [155]

([Abschnitt .4](#))

Publikation als Coautor:

Moyira Osny Aquino Gil, Mattis Kupferschmid *et al.*

„Apart From Rhoptries, Identification of *Toxoplasma gondii*'s O-GlcNAcylated Proteins Reinforces the Universality of the O-GlcNAcome.“

In: *Frontiers in endocrinology* 9 (2018), S.450

DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00450> [11]

([Abschnitt .5](#))

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINFÜHRUNG	1
1	EINFÜHRUNG	2
1.1	<i>Plasmodium falciparum</i> - der Erreger der Malaria tropica	2
1.1.1	Die Malariaerreger	2
1.1.2	Kleine Geschichte der Malaria	3
1.1.3	Der Lebenszyklus der Plasmodien	4
1.1.4	Die Phylogenetik von <i>P. falciparum</i>	8
1.1.5	Epidemiologische, biosoziale und ökonomische Bedeutung der Malaria	9
1.1.6	Geographie der Erkrankung	10
1.1.7	Epidemiegebiete	11
1.1.8	Die Entwicklung von Immunität	12
1.1.9	Genetische Modifikationen als Schutz vor Infektionen	14
1.1.10	Klinische Symptomatik und Pathophysiologie	15
1.1.11	Diagnostik	19
1.1.12	Malariatherapie	21
1.1.13	Vektorkontrolle	25
1.2	Die posttranslationale Modifikation O-GlcNAc	29
1.2.1	Posttranslationale Modifikationen	29
1.2.2	Glykosylierung	29
1.2.3	N-Glykosylierung	30
1.2.4	O-Glykosylierung	30
1.2.5	O-GlcNAc – Ein Sonderfall	32
1.2.6	Eine gut versteckte Modifikation	32
1.2.7	Die hohe Dynamik des O-GlcNAcs	34
1.2.8	Der Zyklus der Modifikation	34
1.2.9	Phylogenetik der O-GlcNAcylierung	36
1.2.10	Die Beteiligung der O-GlcNAcylierung an zellulären Prozessen	36
1.2.11	O-GlcNAcylierung und Pathogenese	37
1.2.12	Nachweis der O-GlcNAcylierung bei <i>P. falciparum</i>	37
II	HAUPTTEIL	39
2	ZIELSETZUNG	40
3	MATERIAL	41
3.1	Geräte	41
3.2	Verbrauchsmaterialien	42
3.3	Chemikalien	42
3.4	Nukleotidzucker	44
3.5	Kits	45
3.6	Antikörper	45
3.7	Lösungen, Puffer, Nährmedien	46
3.7.1	Färbelösungen	46
3.7.2	Pufferlösungen	47
3.7.3	<i>P. falciparum</i> In-vitro-Kultur	49
3.8	Parasiten	49
4	METHODEN	50

4.1	Kultivierung von <i>P. falciparum</i>	50
4.1.1	Kulturbedingungen	50
4.1.2	Kontrollausstriche	50
4.1.3	Vermehrung der Parasitenkultur	50
4.1.4	Parasitenaufreinigung	50
4.1.5	Lyse der Parasiten	51
4.1.6	Anfertigen und Auftauen von Kryopreservaten	52
4.1.7	Waschen der Erythrozyten	52
4.1.8	Reinigung des FFPs	52
4.2	Proteinnachweis	53
4.2.1	Proteinextraktion	53
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
4.2.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	53
4.2.4	Färbung der Gele	54
4.2.5	Western Blot	54
4.2.6	Der RL2-Antikörper	55
4.2.7	Biotin-Markierung O-GlcNAcylierter Proteine mit ClickIt™	56
4.3	Identifizierung O-GlcNAcylierter Proteine	57
4.3.1	Anreicherung O-GlcNAcylierter Proteine mit Streptavidin Perlen	57
4.3.2	Anreicherung O-GlcNAcylierter Proteine mit sWGA Perlen	58
4.3.3	Abspaltung von N-glycosidisch gebundenem GlcNAc	58
4.3.4	Vorbereitung der Banden zur Massenspektroskopie	59
4.3.5	Massenspektroskopie	60
4.4	Bioinformatische Methoden	61
4.4.1	Auswertung der LC-MS Ergebnisse mit Mascot	61
4.4.2	Ermittlung potentieller O-GlcNAc Stellen mit YinOYang 1.2	61
4.5	Chromatographische Bestimmung der UDP-GlcNAc Konzentration	62
4.5.1	Extraktion und Entsalzung der Proben	62
4.5.2	Erstellung der Nukleotid Standards	62
4.5.3	Chromatografische Konzentrationsbestimmung	63
4.6	Inkubation mit Thiamet-G	63
4.6.1	Anfertigung der Kulturen	63
5	ERGEBNISSE	65
5.1	Darstellung des O-GlcNAcoms von <i>P. falciparum</i>	65
5.1.1	Inkubation mit dem Antikörper RL2	65
5.1.2	Enzymatische Kopplung durch <i>Click-chemistry</i>	66
5.1.3	Bindung an sWGA	69
5.2	Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine	71
5.2.1	Nachweis O-GlcNAcylierter Proteine über spezifische Antikörper	71
5.2.2	Auswahl O-GlcNAcylierter Proteine für die Massenspektroskopie	71
5.2.3	Identifizierung des O-GlcNAcoms in der Massenspektroskopie	74
5.3	Bioinformatische Bestimmung möglicher O-GlcNAcylierungs-Stellen	76
5.3.1	Genauere Untersuchung bei alpha-Tubulin	76
5.4	Bestimmung der UDP-GlcNAc Konzentration	82
5.5	Auswirkung der O-GlcNAcase-Inhibition auf das Wachstum	88
6	DISKUSSION	90
6.1	Die Identifizierten O-GlcNAcylierten Proteine	90
6.1.1	Proteine der Glykolyse	91
6.1.2	Hitzeschockproteine	93
6.1.3	Proteine des Zytoskeletts	93

6.1.4	Weitere potentielle Ziele von O-GlcNAcylierung	94
6.2	Die Bedeutung von UDP-GlcNAc für den Parasiten	95
6.3	Phylogenetische Erkenntnisse	95
6.4	O-GlcNAcylierung als möglicher neuer Ansatzpunkt für eine Therapie .	96
6.4.1	O-GlcNAcylierung und Parasitenentwicklung	96
6.4.2	Hemmung der OGA	97
6.4.3	Wie funktioniert die O-GlcNAcylierung bei <i>P. falciparum</i>	97
III	APPENDIX	98
.1	Poster 1	99
.2	Konferenzbeitrag	100
.3	Poster 2	101
.4	Paper 1	102
.5	Paper 2	103
	LITERATUR	104
	Verzeichnis der akademischen LehrerInnen	139
	Danksagung	140

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Blutstadien von <i>P. falciparum</i>	6
Abbildung 2	Lebenszyklus der Plasmodien	8
Abbildung 3	<i>N</i> -Glykosylierung	31
Abbildung 4	Erster Nachweis von <i>O</i> -GlcNAc (Schematisch)	33
Abbildung 5	Inkubation eines Rohextrakts mit RL2	66
Abbildung 6	Darstellung des <i>O</i> -GlcNAcoms durch RL2	67
Abbildung 7	Funktionsweise <i>click-chemistry</i>	67
Abbildung 8	Darstellung des <i>O</i> -GlcNAcoms durch <i>click-chemistry</i>	68
Abbildung 9	<i>O</i> -GlcNAcylierungen zu verschiedenen Entwicklungsstadien	69
Abbildung 10	Darstellung des <i>O</i> -GlcNAcoms durch Bindung an sWGA . .	70
Abbildung 11	<i>O</i> -GlcNAcylierung von α -Tubulin	71
Abbildung 12	<i>O</i> -GlcNAcylierung von HSP70	71
Abbildung 13	Anreicherung <i>O</i> -GlcNAcylierter Proteine nach <i>click-chemistry</i>	72
Abbildung 14	Anreicherung <i>O</i> -GlcNAcylierter Proteine durch sWGA . . .	73
Abbildung 15	Funktion der identifizierten Proteine	74
Abbildung 16	<i>O</i> -GlcNAcylierungswahrscheinlichkeit der Proteine	81
Abbildung 17	Mögliche <i>O</i> -GlcNAcylierungs-Stelle von α -Tubulin:	81
Abbildung 18	Hexosamin-Biosyntheseweg	83
Abbildung 19	UDP-GlcNAc	83
Abbildung 20	HPAEC: Kontroll- und Kalibrierungsstandard	85
Abbildung 21	HPAEC: <i>P. falciparum</i> und Kontrolle	86
Abbildung 22	HPAEC: Auswertung	87
Abbildung 23	Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit durch Thiamet-G	89

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Liste der in der Massenspektroskopie identifizierten Proteine	75
Tabelle 2	<i>O</i> -GlcNAcylierungs-Potential der identifizierten Proteine . .	77
Tabelle 3	Chromatografische UDP-GlcNAc Bestimmung	84
Tabelle 4	HPAEC: UDP-GlcNAc-Gehalt <i>P. falciparum</i> vs. MRC-5	87
Tabelle 5	Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit durch Thiamet-G	88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACT	<i>Artemisinin-Based Combination Therapy</i>
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
ADP-GLC	Adenosindiphosphat-Glukose
AGM ₁	Phospho-GlcNAc Mutase 1
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ALG	Alpha-Glucosyltransferase
AMA	<i>Apical Membrane Antigen</i>
AN.	<i>Anopheles</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP _{ASE}	Adenosintriphosphatase
CMP	Cytidinmonophosphat
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
CP	Zircumsporozoiten-Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethan
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> /Desoxyribonukleinsäure
DPM	Dolichol-Phosphat Mannosyltransferase
DoL-P	Dolichol-Phosphat
DOLK	Dolicholkinase
DTT	Dithiothreitol
EBA	<i>Erythrocyte Binding Antigen</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroencephalographie
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

EIR	<i>Entomological Inoculation Rate</i>
EK	Erythrozytenkonzentrat
ER	<i>Endoplasmatisches Reticulum</i>
ETD	<i>electron transfer dissociation</i>
FFP	<i>Fresh Frozen Plasma</i>
G6PD(H)-MANGEL	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAL	Galaktose
GALNAC	N-Acetylgalactosamin
GCK	Glucokinase
GFAT	Glutamin:Fructose-6-Phosphat Amidotransferase
GLC	Glukose
GLCNAc	N-Acetylglucosamin
GLN	Glutamin
GLT	Glutamat
GNPNAT ₁	GlcNH ₂ -6-Phosphat N-acetyltransferase 1
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRP-78	78 kDa <i>glucose-regulated protein</i>
GS	Glutamat-Ammonium-Ligase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hsp	Hitzeschockprotein
iRBC	infizierte Erythrozyten
IRS	<i>indor residual spraying</i>
ITN	imprägnierte Bettnetze
KHARP	Knob-Associated Histidine-Rich Protein
LC	Flüssigchromatographie
LLIN	<i>long-lasting insecticidal net</i>
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>

MPDU₁ *Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein*

MRC-5 *Medical Research Council cell strain 5*

MS *Massenspektrometrie*

MSP *Merozoiten Oberflächen Protein*

NADPH *Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat*

NEUNAC *N-Acetylneuraminsäure*

NSDAP *Nationalsozialistische Deutsche Arbeiterpartei*

OGA *O-GlcNAcase*

O-GlcNAc *O-glykosidisch gebundenes N-Acetylglucosamin*

O-GlcNAcylierung *O-N-acetylglucosaminierung*

OGT *O-GlcNAc Transferase*

mOGT *mitochondriale OGT*

ncOGT *nukleocytoplasmatische OGT*

sOGT *short OGT*

OST *Oligosaccharyltransferase*

P. FALCIPARUM *Plasmodium falciparum*

P. MALARIAE *Plasmodium malariae*

P. VIVAX *Plasmodium vivax*

PBS *phosphatgepufferte Salzlösung*

PCR *Polymerase Chain Reaction/Polymerase-Kettenreaktion*

PFEMP *Pf-erythrocyte membrane proteins*

PFHRP₂ *P. falciparum histidinreiches Protein 2*

PGI *Phosphoglucose-Isomerase*

PNGase F *Peptid-N-Glykosidase F*

PTM *Posttranslationale Modifikation*

RDT *Rapid Diagnostic Test*

SEC *SECRET AGENT*

SDS *Natriumdodecylsulfat*

SDS-PAGE *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SPY *SPINDLY*

sWGA *Succinyliertes Weizenkeim-Lektin*

T. GONDII *Toxoplasma gondii*
TBS *Tris-buffered saline*
TEMED *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamin
TGF *Transforming growth factor*
TPR *Tetratricopeptide*
TRAP *Thrombospondin-related Anonymous Protein*
TREGS *regulatorische T-Zellen*
TRIS *Tris(hydroxymethyl)-aminomethan*
TWEEN-20 *Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat*
UAP *UDP-GlcNAc Pyrophosphorylase*
UDP *Uridindiphosphat*
UDP-GALNAC *Uridindiphosphat-N-Acetylgalactosamin*
UDP-GlcNAc *Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin*
UK *United Kingdom/Vereinigtes Königreich*
UMP *Uridinmonophosphat*
UN *United Nations/Vereinte Nationen*
uRBC *uninfizierte Erythrozyten*
USD *US-Dollar*
WHO *World Health Organisation*

Teil I

EINFÜHRUNG

EINFÜHRUNG

1.1 PLASMODIUM FALCIPARUM - DER ERREGER DER MALARIA TROPICA

1.1.1 Die Malariaerreger

Neben *Plasmodium falciparum* (*P. FALCIPARUM*) dem Erreger der Malaria tropica, welcher Objekt dieser Untersuchung ist, gibt es vier weitere humanpathogene Malaria Erreger. *Plasmodium vivax*, Erreger der Malaria tertiana, ist neben *P. falciparum* die Art mit der höchsten Bedeutung für die öffentliche und die globale Gesundheit. Die durch *P. vivax* ausgelöste Malaria tertiana kann ebenfalls zu der Komplikation einer schweren Malaria ([Unterabsatz 1.1.10.2](#)) führen, wenn auch weitaus seltener als die Malaria tropica. Charakteristisch für Malaria tertiana sind die alle drei Tage rezidivierenden heftigen Fieberschübe. Dieses sogenannte Drei-Tage-Fieber findet seine Ursache in der synchronen Reifung und Teilung der Parasiten in den Erythrozyten ca. alle 72 h. Nach dieser Zeit platzen die infizierten Zellen, sodass die Parasiten in den Kreislauf gelangen, wo sie in Kontakt mit dem Immunsystem kommen. Sie infizieren frische Erythrozyten und die Teilung beginnt von neuem. Das Verbreitungsgebiet des *P. vivax* ist größer als das von *P. falciparum*, da der Parasit auch bei niedrigeren Temperaturen und in höheren Höhenlagen überleben kann. Daher ist der Erreger für einen überwiegenden Teil der Malariafälle in der Mittelmeerregion, den höher gelegenen Regionen in Zentralamerika sowie großen Teilen Südostasiens verantwortlich [132]. Die in viertägigem Rhythmus Fieberschübe auslösende Malaria quartana wird durch *Plasmodium malariae* verursacht. Die Schübe entstehen analog der Tertiana, der längere Zeitraum ist durch die langsamere Reproduktionsrate von *P. MALARIAE* im Blut bedingt. Der Parasit ist vorwiegend im Sub-Sahara- und Pazifik-Raum verbreitet. Die Infektion gilt als weniger schwerwiegend und leichter behandelbar als die mit den zuvor genannten Arten. Ebenfalls weniger heftig fallen Infektionen mit dem vor allem in lokal begrenzten Regionen in Afrika und Südasiens vorkommenden *Plasmodium ovale* aus [186]. Eine hauptsächlich Makaken betreffende Form der Malaria löst der Parasit *Plasmodium knowlesi* aus. Eine Infektion von Menschen durch den Erreger wurde erstmals 2004 in Borneo entdeckt [241]. Inzwischen sind Fälle aus nahezu ganz Südostasien bekannt geworden. In ihrem klinischen Verlauf entspricht die *knowlesi*-Malaria einer Infektion mit *P. vivax*. Auch hier sind einzelne Fälle einer schweren Malaria beschrieben [240].

1.1.2 Kleine Geschichte der Malaria

In Anbetracht der alten Bezeichnung Protozoon „Urtierchens“ für die Klasse des Malariaerregers *Plasmodium* überrascht es nicht, dass auch die Malaria als eine „Urkrankheit“ gelten kann. Mithilfe von *Polymerase Chain Reaction*/Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Analysen wurde bei ägyptischen Mumien, deren Alter auf 3500 vor unserer Zeitrechnung datiert werden, Plasmodien *deoxyribonucleic acid*/Desoxyribonukleinsäure (DNA) nachgewiesen [190]. Die ältesten Berichte aus der westliche Welt über den Verlauf der Erkrankungen, stammen von Hippokrates, der die verschiedenen Fieberverläufe der Krankheit in seinen Schriften *Epidemien* und *Aphorismen* beschrieb. Spuren verschiedener alter Erklärungstheorien für die Ursache der Erkrankung, finden sich in noch heute gängigen Bezeichnungen der Krankheit. Der französische Name *paludisme* leitet sich von der lateinischen Bezeichnung für Sumpf (*palus*) her. Genauso die Deutsche Bezeichnung „Marschfieber“. Hier zeigt sich der enge Zusammenhang von Malaria-Epidemien in Europa mit Sumpfgebieten als Brutstädte der *Anopheles*-Mücke. Ein prominentes Beispiel hierfür sind die südlich von Rom gelegenen Pontischen Sümpfe, deren Trockenlegung durch Benito Mussolini zu einem starken Rückgang der Malaria in der Region führte, welche durch die erneute Flutung durch die Deutsche Wehrmacht, zur Abwehr alliierter Landungstruppen 1943, vorübergehend wieder rückgängig gemacht wurde [94]. Der Ursprung der Bezeichnung Malaria, *mal aria* (ital.: schlechte Luft), spiegelt einen anderen Erklärungsversuch wieder, der den Ursprung der Krankheit in der Inhalation giftiger Dämpfe zum Teil ebenfalls aus Sümpfen entsteigend, sieht [51]. Erst als mit Pasteurs Keimtheorie die Suche nach den kleinen Ursachen großer Erkrankungen mit Hilfe von Labortechnik begann, gelang es Charles Louis Alphonse Laveran am 6. November 1880 bei Blutuntersuchungen an 44 Malariakranken, einen Parasiten als Verursacher der Krankheit auszumachen [159]. Ronald Ross glückte es schließlich 1897, Stechmücken als Vektor der Krankheit zu identifizieren. Ihm war im Magen der Mücken ein Pigment aufgefallen, das dem Pigment des Malariaparasiten, dem Hämozoïn, im Menschen gleich [217]. Umstritten war jedoch wie die Parasiten von der Stechmücke wieder auf den Menschen übertragen werden. Hierfür kursierten mehrere Theorien wie die Übertragung über Larven oder Eier im Wasser, oder über Parasiten, die in der Erde überleben. In den darauffolgenden Jahren gelang es Ross den gesamten Entwicklungskreislauf der aviären Malaria an Spatzen samt Rückübertragung durch den Insektenstich, nachzuweisen. Den Italienern Bignami und Grassi gelang es 1909, einen gesunden Patienten durch einen Mosquitostich mit Malaria zu infizieren. Dies geschah jedoch in einer Umgebung, in der Malaria endemisch war. Schließlich infizierte Patrick Manson, der britische „Vater der Tropenmedizin“ seinen Sohn in England mit dem Stich einer Mücke, die er von den Italienern erhalten hatte und wies den Infektionsweg somit unanfechtbar nach. Ein wie eine *Chronique scandaleuse* zu lesender Wettstreit

zunächst zwischen Wissenschaftlern verschiedener Nationen, dann zwischen den beiden Briten Manson und Ross darüber, wer den Infektionsweg zuerst entdeckte, war entfacht. Bei den gegenseitigen Vorwürfen, die bis hin zu kleinlichen Auseinandersetzungen vor Gericht gingen, bezeichnete sich zwischendurch sogar das „Urgestein“ der deutschen Infektiologie, Robert Koch, als der eigentliche Begründer der Mosquito-Vektor-Theorie. Letztlich konnten sich Ross und Leveran mit Erhalt des Nobelpreises 1902 und 1907 als Gewinner dieses Wettstreites ansehen [104]. Auf dem Verständnis des Lebenszyklus des Parasiten und der Übertragung durch seinen Vektor aufbauend, konnte der Malaria der Kampf angesagt werden. Ein Kampf in dem mit der Eradikation der Krankheit in großen Teilen Europas, den USA und Kanada, Nordasiens und Australiens ein erster Sieg errungen wurde.

1.1.3 Der Lebenszyklus der Plasmodien

1.1.3.1 Das präerythrozytäre Stadium

Die Infektion des Menschen mit Malaria beginnt mit dem Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke. Die Mücke injiziert nur relativ wenige Parasiten (<10-100) im Sporozoiten-Stadium, vor allem während „Probestichen“ auf der Suche nach Blutgefäßen [203]. Die Parasiten bleiben zunächst unter der Haut und gelangen dann, nach wenigen Stunden über das Blut und zu einem Fünftel über den Lymphweg, in die Leber [307]. Um aus dem Lebersinus in den Disseiraum (dem Spalt zwischen den Leberkapillaren und den Hepatozyten) zu gelangen, passieren sie höchstwahrscheinlich die Kupffer-Zellen [134]. Nach der Passage mehrerer Hepatozyten, nisten sie sich schließlich in einem solchen ein und beginnen mit der ersten ungeschlechtlichen Teilung [184]. 5,5 Tage verbleiben die *P. falciparum* Sporozoiten in den Leberzellen und teilen sich, bis der Schizont und die Zelle rupturieren und tausende Merozoiten in den Kreislauf gelangen [46].

1.1.3.2 Invasion der Erythrozyten

Kommt der freie Merozoit in Kontakt mit einem Erythrozyt, gleitet er zunächst nach loser Bindung an dessen Oberfläche über die Zelle, um zu verifizieren, dass es sich um eine zur Invasion geeignete Zelle handelt. Daraufhin reorientiert sich der Parasit, sodass sein apikales Ende zur Erythrozytenmembran gerichtet ist. Über „tight junctions“ bindet er die Membran und stülpt sich in die Zelle [50]. Bei der Ausrichtung und Invasion dient dem Sporozoiten das sogenannte *glideosom*. Wichtige Elemente dieses Proteinapparats sind Aktin, Myosin A, Aldolase – eigentlich ein Protein der Glykolyse – und das *Thrombospondin-related Anonymous Protein* (TRAP) [189]. Für die Ausrichtung ist das Protein AMA-1 von Bedeutung; bei der eigentlichen Invasion die EBA Proteine, die an Glykoproteine der Erythrozytenmembran binden [250]. Die bei der Invagination der Membran gebildete Tasche dient dem Parasiten in der

Zelle als eine Art Taucherglocke. In dieser sogenannten parasitophoren Vakuole richtet sich der Parasit ein ihm genehmes Milieu sowie den von ihm benötigten hohen Ca^{2+} -Spiegel ein [22]. Für die Invasion bleiben den Merozoiten nur kurze Zeit. Nach wenigen Minuten beginnen sie abzusterben. Ihre Halbwertszeit im Blut liegt bei 10 Minuten [35].

1.1.3.3 *Das erythrozytäre Stadium*

Während den ersten 26 Stunden ähneln die Parasiten im Blutausschlag einem oder mehreren Siegelringen (Abbildung 1.1–Abbildung 1.10). Daher wird dieses Stadium als Ringstadium bezeichnet. Die Ringe werden dicker und reichern als sog. Trophozoiten Hämoglobin an, welches sich im Mikroskop als dunkle Flecke in den Blutzellen ausmachen lässt (Abbildung 1.11–Abbildung 1.20). Nach ca. 36 Stunden beginnen die Trophozoiten mit der meiotischen Teilung. Nach 44–48 Stunden ist der Schizont ausgereift (Abbildung 1.21–Abbildung 1.31) [46]. Er besteht nun aus 6–36 Merozoiten, die im sogenannten Egress nach Ruptur der parasitophoren Vakuole und anschließender Ruptur der Erythrozytenmembran, in den Kreislauf zurückgelangen, wo sie neue Erythrozyten infizieren (Abbildung 1.32).[292].

Eine Besonderheit des Blutstadiums von *P. falciparum* ist die Sequestrierung: Die Adhäsion der infizierten Erythrozyten (iRBC) an das Endothel der Blutgefäße, vor allem in den Venen aller Organe, mit Ausnahme von Lunge und Milz. Die Adhäsion erfolgt nach dem gleichen Muster wie die Anfangsphase der Leukodiapedese weißer Blutkörperchen, mit Annäherung, Rollen und schließlich fester Bindung an die Membran [308]. Hierfür bilden sie an der Membran der iRBC kleine knobartige Adhäsionsstellen, sogenannte *knobs* [182]. Mehrere parasitäre Proteine (das Knob-Associated Histidine-Rich Protein (KHARP) und die *Pf-erythrocyte membrane proteins* (PFEMP)-2 und -3) interagieren mit Cytoskelettelementen der iRBC Membran, PFEMP-1 mit dem Endothel [233]. Die *knobs* tragen zudem zu der sehr hohen Steifheit der Membran von iRBCs, im Vergleich zu nicht infizierten Zellen, bei [317]. Vermutlich dient die Sequestrierung dazu, möglichst viele iRBCs, der Reinigung durch die Milz zu entziehen [46].

Eine der Sequestrierung ähnelnde Eigenschaft von *P. falciparum* infizierten Blutzellen ist das rosettenförmige Binden uninfizierter Erythrozyten (uRBC) um sich. Ob dieses *rosetting*, das in Zellkulturen gut zu beobachten ist, auch *in vivo* vorkommt, ist schwer nachzuweisen. Es besteht jedoch eine Korrelation zwischen der Fähigkeit verschiedener Erreger zu *rosetting* und der Schwere von Malariaerkrankungen [47].

1.1.3.4 *Geschlechtliche Stadien im Blut*

Neben der ungeschlechtlichen Teilung in den Blutzellen entwickeln sich einige der Trophozoiten zu geschlechtlichen Zellen. Als Auslöser der sogenannten Gametozytogonie wirkt Erythropoetin. Dieses wird in Folge einer Anämie verstärkt ausgeschüttet, um den Ersatz verlorengegangener Erythrozyten zu aktivieren. Somit ist

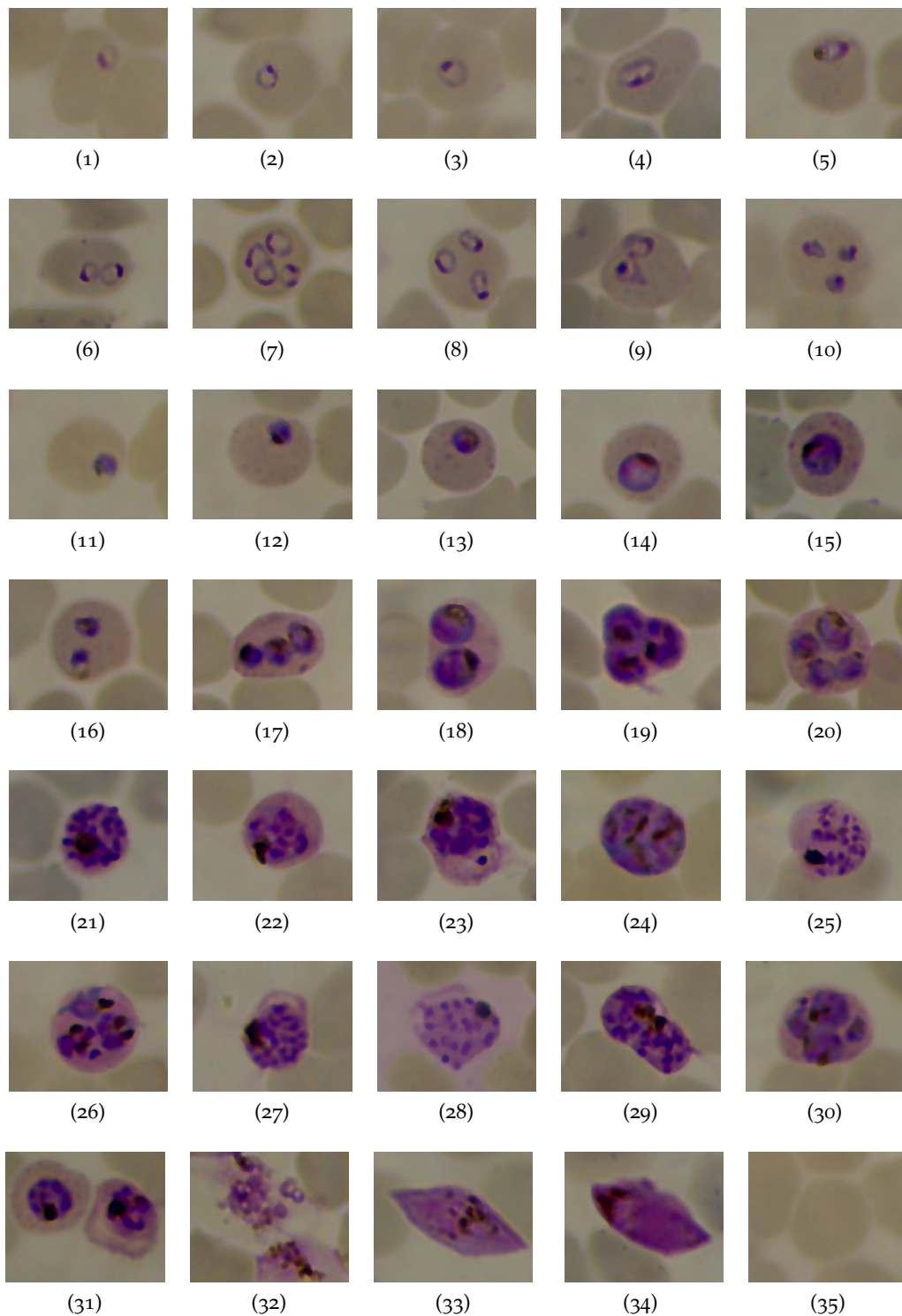


Abbildung 1: Blutstadien von *P. falciparum*
 (1)-(10) Ring Stadium, (11)-(20) Trophozoiten,
 (21)-(31) Schizonten, (32) freie Merozoiten,
 (33)-(34) Gametozyten, (35) uninfizierter Erythrozyt
 Quelle: eigene Fotos

es ein guter Zeitgeber für eine Geschlechtsreifung bei vorgeschrittener Parasitämie [198]. Schon im Schizonten-Stadium fällt die Entscheidung zur Entwicklung, so dass alle aus einem Schizonten stammenden Merozoiten nach der Infektion neuer Erythrozyten, entweder mit der Mitose fortfahren, oder sich zu Geschlechtszellen entwickeln [37]. Entwickeln sie sich zu Gametozyten (geschlechtlichen Zellen), haben alle aus einem Schizonten stammenden Gametozyten das gleiche Geschlecht [238]. In den 8–12 Tagen ihrer Entwicklung durchlaufen die Gametozyten 5 Stadien (I–V). Sehen sie in Stadium I noch so aus wie ungeschlechtliche Trophozoiten, so verformen sie sich im Laufe der Entwicklung über eine spindelartige Form (Stadium IV, [Abbildung 1.33](#)–[Abbildung 1.34](#)) hin, zu der für *P. falciparum* charakteristischen Bananenform der reifen Geschlechtszellen (Stadium V) [19]. Während ihrer Entwicklung entziehen sich auch die Gametozyten durch Sequestrierung dem Blutkreislauf und somit der Elimination in der Milz. Erst mit Erreichen des Stadium V, lösen sie sich von der Zellwand und können von einer Stechmücke über die Blutmahlzeit aufgenommen werden [34]. Die Geschlechtsverteilung der Gametozyten liegt auf Seiten der weiblichen Zellen, wobei aus einem männlichen Gametozyten 4 bis 8 Gameten entstehen, während aus einem weiblichen Gametozyten nur ein Gamet entsteht. Eine Erklärung hierfür wäre, dass eine Immobilisierung der aktiv suchenden männlichen Gameten eine Befruchtung eher unterbinden würde als die der wartenden weiblichen Gamete. Somit ist es ein Selektionsvorteil einen Überschuss an männlichen Parasiten zu produzieren [198].

1.1.3.5 Vermehrung im Mosquito

Die Aufnahme durch die Stechmücke bedeutet zunächst eine krasse Umstellung der Umgebungsbedingungen für den Parasiten. Die Umgebungstemperatur sinkt um 5 °C ab und der pH steigt von 7,4 auf bis zu 8,0–8,2 [30]. Noch während der Mosquito seine Blutmahlzeit aufnimmt, verlassen die Gameten beider Geschlechter die Erythrozyten. Die männlichen Gameten durchlaufen innerhalb von 15 Minuten drei Teilungen. Jede, der aus diesen Teilungen hervorgegangenen Mikrogameten, ist mit einer Flagelle ausgerüstet. Sie ist nun mobil und kann sich auf die Suche nach einer weiblichen Gamete machen und diese befruchten [239].

Mit dem Verschmelzen der Gameten entsteht die diploide Zygote. Hier finden die zwei Schritte der Meiose statt. Aus dem diploiden werden vier haploide Chromosomensätze in getrennten Kernen, die sogleich mit der Elongation beginnen [111]. Die so aus der Zygote entstandene Ookinete ist noch hoch mobil. Mit Hilfe von Chitinasen frisst sie sich durch die peritrophische Membran des *Anopheles*-Mitteldarms, einer der Glykokalix bei Säugern ähnlichen Schutzschicht aus Glykoproteinen und Chitin fibrillen. Daraufhin bindet sie an die Mitteldarm-Oberfläche und beginnt mit der Invasion und Durchwanderung der Epithelzellen. Dieser Schritt erfordert die Interaktion einer Vielzahl von Liganden, die es der Ookinete ermöglichen, über mindestens zwei alternative Wege in die Zellen zu gelangen [276]. An der Basal-

membran angekommen verliert die Ookinete ihre Mobilität. Sie wächst zur Oozyste an und beginnt mit der Zellteilung. In der sogenannten Sporogonie entstehen binnen 12–18 Tagen mehrere tausend Zellkerne. Nach Reifung der Sporozoiten bricht die dicke Zellwand der Oozysten auf und die Sporozoiten wandern in Richtung der Speicheldrüsen. Sie sind nicht unmittelbar infektiös, sondern ihre Fähigkeit, Säugetiere bei einem Stich durch die Mücke zu infizieren, kommt mit einiger Verzögerung [239]. Nur ein kleiner Teil der ursprünglich aufgenommenen Gametozyten durchlaufen alle diese Entwicklungsschritte. Nach Verlust des Schutzes durch die Erythrozytenmembran erliegen viele der Gameten Angriffen durch das Komplement und durch Leukozyten sowie der Immobilisierung durch Antikörper und Oxidierung durch Sauerstoffradikale. Viele Mosquitos werden trotz der Aufnahme von Gametozyten nicht infiziert. Aus tausend aufgenommenen Gametozyten erreichen ca. fünf das Stadium der Oozyste [245].

LEBENSZYKLUS IM MOSQUITO (vgl. Unterabsatz 1.1.3.5)

LEBENSZYKLUS IM MENSCHEN (vgl. Unterabsatz 1.1.3.1)

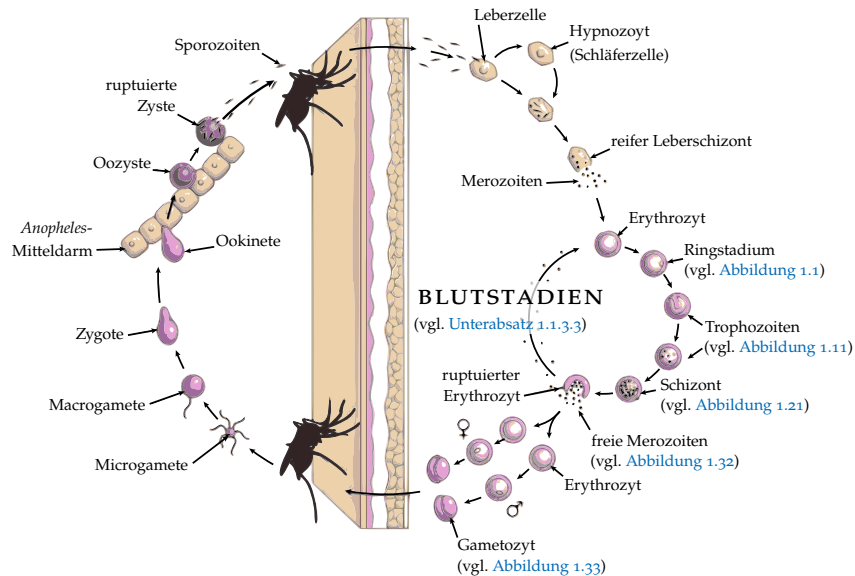


Abbildung 2: Lebenszyklus der Plasmodien

Nach *Life cycle of the malaria parasite* from Epidemiology of Infectious Diseases. Available at: <http://ocw.jhsph.edu> Copyright Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. Creative Commons BY-NC-SA. (modifiziert)

1.1.4 Die Phylogenetik von *P. falciparum*

Das Forschungsfeld der Phylogenetik hat sich durch die DNA-Sequenzanalyse deutlich verändert. Wurden zuvor mikroskopisch oder in einfachen biochemischen Versuchen bestimmbare Eigenschaften zur taxonomischen Einteilung genutzt, so wird nun versucht, die Spezies anhand genetischer Merkmale in eine evolutionsbiologische Systematik einzuordnen.

Zunächst waren *Plasmodien* der Gruppe der Protozoen oder Protisten zugeordnet, die vormals eine Art Sammelbezeichnung aller Eukaryonten bildete, welche weder dem Reich (*kingdom*) der Tiere (*animalia*), noch dem der Pflanzen (*plantae*), oder dem später hinzugekommenen der Pilze (*fungi*) angehörten [227]. Der aus den Unmengen an neu sequenzierter biogenetischer Information entstandenen Komplexität ist es geschuldet, dass momentan mehrere divergierende bzw. konkurrierende Systematiken bestehen, die auch intern regelmäßigen Veränderungen unterliegen. In den am weitesten verbreitenden Systematiken nach Adl und nach Cavalier-Smith schieden die Apicomplexae inzwischen aus dem *kingdom* der Protozoen aus und wurden Teil eines neu definierten *kingdoms*, den *chromista* [3, 222]. Zu dieser Gruppe, die Spezies vereint, welche unter anderem Chlorophyll-c beinhaltende Plastide besitzen, oder diese in ihrer Entwicklung besaßen und verloren, zählen die Apicomplexae [42].

Der Apicoplast dieses Pylum ist das Überbleibsel einer von Vorläuferzellen im Sinne einer sekundären Endosymbiose phagozytierten Rotalgenart und ist dem Chloroplasten der Pflanzen verwandt. Die parasitäre Lebensweise der Apicomplexae wurde erst später eingeschlagen. Daraus resultierte wahrscheinlich im Verlauf der Verlust der Fähigkeit zur Photosynthese. Diese Abzweigung des eukaryontischen Stammbaumes liegt phylogenetisch noch vor der Entwicklung der *plantae*, *animalia* und *fungi* [13, 262].

1.1.5 Epidemiologische, biosoziale und ökonomische Bedeutung der Malaria

Knapp 230 Millionen Menschen erkrankten im Jahr 2019 laut Schätzungen der *World Health Organisation* (WHO) an Malaria. Die Krankheit forderte annähernd 410.000 Tote, die meisten im Säuglings- und Kindesalter [304]. Malaria ist neben HIV/AIDS und Tuberkulose eine der drei Infektionskrankheiten, für deren Eindämmung und Prävention die höchsten finanziellen und politischen Anstrengungen unternommen werden. Das „Erzwingen des Rückzugs der Malaria“ war im Jahr 2000 Teil der UN-Millennium-Entwicklungsziele [277] und findet sich auch in deren Fortführung, den „Sustainable Development goals“ [278]. Zwischen 2010 und 2015 wurden weltweit 1260 Millionen US-Dollar (USD) für die Erforschung von Malariamedikamenten, 798 Millionen USD für Impfforschung und 191 Millionen USD für Forschung der Vektorkontrolle ausgegeben [302]. Und der Erfolg ist nicht ausgeblieben. Seit Beginn des neuen Jahrtausends ist es gelungen, die Mortalität der Erkrankung zu halbieren [300]. In den vergangenen drei Jahren jedoch kam es jedoch zu einem Sistieren und in manchen Regionen sogar zu einer Umkehr dieses Fortschritts. Dies geschah vor allem durch das Aufkommen von Kriegen und wirtschaftlichen Krisen. In der Ost Mittelmeer-Region sind im Rahmen der dortigen Bürgerkriege und dem damit zusammenhängenden Zerfall des Gesundheitssystems die Zahl der Malaria-toten zwischen 2013 und 2019 um über 38 % gestiegen. Im Jemen haben sich die

Malariainfektionen seit 2015 annähernd verdoppelt. [304]. In Venezuela kam es im Rahmen der aktuellen ökonomischen Krise zu einem Zuwachs der Malariafälle um 69 % innerhalb von einem Jahr [259]. Marcia Caldas de Castro und Monica G. Fisher zeigen, dass eine Steigerung um einen Punkt im *Wealth Index* eines Landes zu einem 4 prozentigen Rückgang der Prävalenz von Malaria Infektionen führt. [41] Der frühere Berater der Weltbank und WHO, Jeffrey Sachs, der den Zusammenhang zwischen der Inzidenz von Malaria und der wirtschaftlichen Entwicklung erforscht, beschreibt jedoch, dass im Gegensatz zu vielen anderen Krankheiten, welche direkte Folge der Armut eines Landes und den damit verbundenen infrastrukturellen Problemen sind, die Malaria in erster Linie nicht vom Reichtum eines Landes oder einer Region, sondern von klimatischen und ökologischen Faktoren determiniert ist. Er sieht die Krankheit daher weniger als Folge, sondern vielmehr als Ursache von Armut. Zum einen seien die Gesellschaften in Epidemieregionen gezwungen, aufgrund der Krankheit hohe Summen auszugeben. So beschreibt die WHO in der „Abuja Declaration“ von 2000, dass sehr armen Familien in einigen Ländern Afrikas bis zu 25 % ihres Jahreseinkommens für die Prävention und Therapie der Malaria ausgeben [294]. Zudem würde aufgrund der hohen Kindersterblichkeit die Geburtenrate gesteigert, wodurch pro Kind weniger Geld für Bildung zur Verfügung stehe. Auch werde, wenn die Lebenserwartung niedrig sei, generell weniger in Bildung investiert. Hinzu kommt die verlorene Arbeits- bzw. Unterrichtszeit durch Krankheitsfehltag. So verpassen Grundschüler in Kenia aufgrund der Krankheit über ein Zehntel ihrer Schultage. Zuletzt wirke sich der Status als Endemiegebiet negativ auf Tourismus und Investitionsstandort aus. Im Zusammenspiel dieser Faktoren sieht Sachs die Ursache dafür, dass Volkswirtschaften mit Malaria zwischen 1965 und 1990 ein durchschnittliches Wirtschaftswachstum von 0,4 % im Jahr verzeichneten, die anderen Staaten eines von 2,3 % [89, 223]. Andere Autoren sehen eine „duale Kausalität“, dass die Erkrankung also sowohl Ursache als auch Folge von Verarmung ist [251] Zu beachten bleibt in diesem Zusammenhang, dass heute ungefähr 90 % der Todesfälle durch Malaria in sub-Sahara Afrika verzeichnet sind und von den 15 Ländern, in denen es weltweit zu 80 % der Infektionen kommt, alle bis auf eines in dieser Region liegen. [303]

1.1.6 Geographie der Erkrankung

In 91 Ländern weltweit wird Malaria übertragen. 21 Länder haben die Krankheit seit der Jahrtausendwende eliminiert und ergreifen nun Maßnahmen, ein Wiederaufkommen der Krankheit auf lange Sicht zu verhindern. Auch in jüngster Zeit wurden weitere Länder als malariafrei erklärt. Paraguay und Usbekistan erhielten dieses Prädikat 2018, Algerien kam 2019 dazu. Weitere elf Länder stehen vor der Eradikation [304]. Die Verteilung der Krankheit ist abhängig von geografischen Aspekten. In Höhenlagen über 2000 Metern sowie bei Temperaturen von über 33 °C

und unter 16 °C kommt Malaria nicht vor. Unter diesen Bedingungen kann die über eine Woche andauernde Entwicklung des Parasiten im Mosquito (Die Sporogonie) nicht stattfinden, selbst wenn *Anopheles* Populationen an diesen Orten überleben könnten. Von den über 200 *Anopheles*-Arten können 80 Malaria übertragen, 66 gelten als natürliche Vektoren. Die einzelnen Arten haben verschiedene Vorlieben was ihre Brutstätten, Flugweiten und die Wahl ihrer Blutmahlzeit angeht. In Gebieten, in denen *Anopheles* Spezies vorherrschen, welche vorwiegend Menschen stechen, ist die Verbreitung von Malaria viel höher als in Regionen, in denen die Vektoren sich überwiegend von Tierblut ernähren. Die in Afrika dominante Formen *AN. gambiae* und *AN. funestus* sind besonders antropophil, wohingegen in Asien in Regionen mit ähnlichen klimatischen Bedingungen die zoophilen Spezies überwiegen [243]. Alle diese Faktoren haben Einfluss auf die lokale Verbreitung der Malaria. [46]. Sind über einen längeren Zeitraum, z. B. während der Trockenzeit keine Stechmücken vorhanden, muss der Parasit im Menschen überleben bis die Vektoren zurückgekehrt sind. Ein Extrembeispiel hierfür ist das *Plasmodium vivax hibernans*, welches in Nordkorea vorkommt und mit extrem langen Inkubationszeiten von 10 bis 12 Monaten ohne Vektor überbrücken kann [93].

1.1.7 Epidemiegebiete

Durch geographische und vor allem klimatische Gegebenheiten bedingte Unterschiede der Übertragung haben großen Einfluss auf Verlauf und Altersverteilung der Krankheit. Abhängig vom Übertragungsniveau lassen sich Endemiegebiete einteilen. Die Differenzierung von sporadischen, hypoendemischen bis hin zu holoendemischen Gebieten können unter anderem anhand der Nachweisbarkeit von Parasiten im Blut oder der Milz wahlweise auch auf Altersgruppen angepasst [172][192], oder über die *Entomological Inoculation Rate* (EIR) die Häufigkeit infektiöser Stiche pro Jahr definiert werden [196][271]. Ein Rückgang der Malariaprävalenz in einer Region wird erst unter einem EIR von eins beobachtet [25]. Der Krankheitsverlauf verändert sich jedoch schon bei Werten weit darüber. In holoendemischen Gebieten mit einer EIR von 100 bis 1000, erreicht die Letalität bei Kindern mit drei Jahren bei über 200 pro 10.000 ihr Maximum. Mit 5 Jahren sterben noch 25 von 10.000 und über 10 Jahren geht die Mortalität gegen Null. In meso- bis hyperendemischen Regionen mit 1–10 EIR im Jahr liegt das Mortalitätsmaximum bei den 5-jährigen bei 50 von 10.000, sinkt jedoch bis zum 20. Lebensjahr nicht unter 25. In hypoendemischen Regionen, bzw. Regionen mit sporadischer Prävalenz (0,01–0,1 EIR) nimmt die Mortalität mit dem Alter sogar zu [5]. Grund für die Abnahme an Infektionen mit dem Alter ist die „Praemunität“. Ein konstanter niedriger Spiegel an asymptomatischer Parasitämie im Körper bewirkt eine relative Immunität. Menschen mit ausreichender Praemunität können mit einem Parasitentiter, bei dem unkonditionierte Menschen schon in Lebensgefahr schweben würden, ganz normal ihrem All-

tag nachgehen. Allerdings verschwindet dieser Effekt ziemlich schnell, wenn sich die Personen einige Zeit außerhalb des Endemiegebiets aufhalten und sich nicht konstant weiter infizieren können. Dies trifft beispielsweise Studierende, die nach jahrelangem Studium im Ausland wieder nach Hause zurückkehren, oder Menschen die zur Arbeitsmigration gezwungen sind. Sie sind genauso bedroht wie Personen aus Regionen mit niedriger oder keiner Prävalenz [71]. Ist es geschafft, die Parasitämie unter ein Niveau zu senken, das zu Praemunität der Bevölkerung führt, muss daher sichergestellt werden, dass die Infektion nicht zurückkehrt, um dann auf eine nicht mehr resistente Bevölkerung zu treffen. Ein abschreckendes Beispiel hierfür ist das madegassische Hochland. Dort wurde in den 50er Jahren die dort ansässige *Anopheles*-Mücke durch Pestizide scheinbar ausgerottet. Nachdem die Inzidenz über Jahre hin auf einige Einzelfälle beschränkt blieb, stellte man die Pestizidanwendung in der Region ein. Die Mücke kam zurück und Malaria forderte über vierzigtausend Tote unter der nun nicht mehr resistenten Bevölkerung [52]. Ob der als großer Erfolg gefeierte Gebrauch imprägnierter Bettnetze und der eventuellen damit verbundene Verlust der Praemunität sich langfristig negativ auswirken wird, kann nicht in randomisierten Studien ermittelt werden, da aufgrund der guten mittelfristigen Wirksamkeit von imprägnierten Bettnetzen eine solche Studie unethisch wäre [246]. Es unterstreicht jedoch, dass trotz des guten Erfolgs der Einsatz von Bettnetzen immer nur Teil einer Eradikationsstrategie bleiben kann. Bei Kindern nimmt die Geschwindigkeit, mit der sie eine ausreichende Praemunität erreichen können, mit dem Alter zu. Daher ist es sinnvoll Säuglinge und Kleinkinder möglichst vor Infektionen zu schützen [18]. Erwähnenswert ist hier, dass an dieser Form der Teilimmunität mit Glycosylphosphatidylinositolen (GPIs), ebenfalls parasitäre Glykoconjungate beteiligt sind [86, 230].

1.1.8 Die Entwicklung von Immunität

Neben der Praemunität lassen sich zwei weitere Formen der Immunität gegen Malaria beschreiben. Zum einen die Immunität gegen die Symptome der Krankheit. D. h. eine geringere Morbidität und Mortalität der Erkrankten gegenüber Menschen ohne Immunität, bei, im Gegensatz zu Praemunität, fehlender persistierender Infektion. Zum anderen die Immunität gegen den Parasiten selbst. Diese führt zu einer geringeren Parasitämie im Körper der Erkrankten [71]. Da die Parasiten während des Durchlaufens der verschiedenen Stadien ihre Oberflächenantigene ändern, kann sich nur eine Stadien-spezifische Immunität entwickeln [1]. Neuere Untersuchungen zur Genexpressierung während des Übergangs von einem Stadium zum nächsten haben jedoch zu der „Cross-Stage-Theorie“ geführt. Deren Verfechter meinen einige Ziele für Impfstoffe gefunden zu haben, welche gegen mehrere Stadien wirksam sein könnten [187]. Eine Immunität gegen die prä-erythrozytären Stadien bleibt umstritten. Auch wenn die Infektionshäufigkeit mit dem Alter nachlässt, so

bleibt die Zeit zwischen Infektionen in holoendemischen Gebieten doch sehr kurz. Zudem zeigten Personen mit einer erweiterten Reinfektionszeit auch eine erhöhte Resistenz, wenn sie in klinischen Versuchen direkt mit Parasiten des Blutstadiums infiziert wurden. Bei Impftests hingegen, bei denen große Mengen abgeschwächter Sporozoiten injiziert wurden, entwickelten die Probanden für einige Zeit absolute Resistenz gegen Infektionen [178]. Eine wichtige Rolle bei der mangelhaften Immunreaktion gegen die prä-erythrozytären Parasiten spielen regulatorische T-Zellen (TREGs). Diese in der Haut ansässigen Zellen sorgen per Immunsuppression dafür, dass nicht jedes mit der Haut in Kontakt kommende Antigen eine sofortige und heftige Immunreaktion auslöst. Plasmodien induzieren diese T-Zellen zu Beginn der Infektion. Die Tregs bilden in hohem Maße *Transforming growth factor* (TGF)- γ und Interleukin-10, zwei anti-inflammatorische Zytokine. Außerdem hemmen sie unreife dendritische Zellen, die für die Antigenpräsentation verantwortlich sind, an der Ausreifung [103]. Im Blut-Stadium hingegen sind die Parasiten angreifbarer. Allein ihre schiere Menge gestattet es ihnen nicht mehr, durch das Immunsystem unentdeckt zu bleiben. Ihr größter Gegner ist nun die Milz, der sie sich durch Sequestrierung zu entziehen versuchen [221]. In der Niere werden die iRBC von dendritischen Zellen erkannt. Diese aktivieren natürliche Killerzellen und CD4 T-Zellen. Zudem werden iRBC von Makrophagen phagozytiert. Eine Hauptfunktion der Milz ist es jedoch, die Blutzellen von den Parasiten zu reinigen. Diese gereinigten Erythrozyten können wieder ihre normale Funktion einnehmen, haben jedoch ihre Flexibilität dauerhaft verloren und eine auf 4–5 Wochen verkürzte Lebenszeit [60]. Diese Reinigung der Erythrozyten ist abhängig von CD8⁺ T-Zellen [224]. Dass die Milz eine Hauptfunktion bei der Erlangung und vor allem den Erhalt von Immunität einnimmt, wenn auch nicht die Einzige, lässt sich aus Daten von splenektomierten Patienten erschließen [17]. Antikörper können Merozoiten abgreifen solange sich diese außerhalb der Erythrozyten befinden. Als Ziel dienen dabei Oberflächenproteine wie das Merozoiten Oberflächen Protein (MSP). Die Bedeutung dieser Funktion zeigt sich durch den raschen Rückgang der Parasitämie nach Injektion der γ -Globuline immuner Erwachsener bei erkrankten Kindern [45]. Die Antikörper-vermittelte Immunität ist jedoch sehr Stamm-spezifisch und schützt nur in begrenztem Maße gegen Reinfektion mit einem anderen *Plasmodien* Stamm, oder gar einer anderen Art. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Menschen aus einem Endemiegebiet mit der Zeit Immunität gegen alle dort vorkommenden Stämme entwickeln. Dies beobachtete man schon bei Patienten, die im Rahmen der Malariatherapie, mit *Plasmodien* infiziert wurden [183]. Die Malariatherapie war in den 1920–50er Jahren die einzig wirksame Therapie bei Progressiver Paralyse, dem Endstadium der Syphilis. Es verstarben jedoch auch 15 % der Patienten an der Therapie [279]. Ein Rolle bei der Verzögerung der Entstehung von Immunität gegen Malaria spielen „atypische“ B-Zellen. Diese veränderten Gedächtniszellen bilden einen großen Anteil (6–51 %) der B-Zellen bei Menschen in Malaria-Ende-

miegebieten. Gedächtniszellen sind wichtig für die schnelle Immunantwort auf eine dem Körper bereits bekannte Erkrankung und damit wichtig für die Wirksamkeit von Immunität. Diese „atypischen“ B-Zellen können nur eingeschränkt Antikörper sezernieren. Zudem ist ihr B-Zell Rezeptor-Signalweg gehemmt, welcher die Immunreaktion nach Antikörperbindung aktiviert [204].

1.1.9 Genetische Modifikationen als Schutz vor Infektionen

Einige rezessiv vererbte Krankheiten bieten in heterozygoter Form einen gewissen Schutz vor Malariainfektionen. In Endemiegebieten sind einige dieser Krankheiten verbreiteter als in der übrigen Welt, da sich die Malariaresistenz und die Nachteile, die mit den Erkrankungen kommen, die Waage halten. Prominentestes Beispiel hierfür ist die Sichelzellenanämie [83]. Bei den Patienten liegt eine Mutation des Hämoglobins vor. Das sogenannte Hämoglobin S bildet unter Sauerstoffmangel Fibrillen und führt dazu, dass die Erythrozyten eine charakteristische Sichelform annehmen und verklumpen. Dabei kann es zu sogenannten Sichelzellkrisen kommen. Verklumpte Blutzellen führen hier zu Thrombosen in kleinen Gefäßen was häufig mit starken Schmerzen, Organversagen bis hin zum Tod noch vor Erreichen des Erwachsenenalters verbunden ist. Selbst Konkurrenten der heterozygoten Form können unter äußerst unangenehmen Krisen leiden [76]. Diesen evolutionären Kompromiss, dass eine in ihrer homozygoten Form tödlichen Krankheit durch ihre Schutzfunktion in der heterozygoten Form einen Selektionsvorteil darstellt, bezeichnet man als „Balancierten Polymorphismus“. Dass diese Balance auch umgekehrt werden kann, zeigt das Beispiel der Malediven. Dort ist die Prävalenz der β -Thalassämie nach vollständiger Eradikation der Malaria in den 70er Jahren stark zurückgegangen [82]. β -Thalassämie ist, wie Sichelzellenanämie eine rezessiv vererbte Krankheit. Auch Thalassämien werden durch eine Mutation der hämoglobinkodierenden Gene verursacht. Dies führt zu mangelhafter Bildung bis hin zum vollständigem Verlust der Bildung von β - bzw. α -Globulin. Ausbreitung findet die Erkrankung vor allem in Zentral- und Nordafrika, im südlichen Asien, Ozeanien sowie im Mittelmeerraum, dem ehemaligen Malariagebiet Europas [287]. In der homozygoten Form führt β -Thalassämie unbehandelt meist schon im Kindesalter zum Tode. Die Möglichkeit der Behandlung besteht auf den Malediven erst seit den 90er Jahren, die Prävalenz war jedoch schon in den 30 Jahren davor von 26 auf 17% gefallen, sodass der Zusammenhang mit dem Rückgang der Malaria klar erscheint [82]. Eine Erkrankung bei der, im Gegensatz zu den vorherigen genannten keine veränderten Globuline vorliegen, ist der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel (G6PD(H)-MANGEL). Die eingeschränkte Funktion des Proteins führt zu einer mangelhaften Bildung von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) über den Pentosephosphatweg. Dies führt vor allem in Erythrozyten dazu, dass Glutathion ein wichtiges Antioxidans nicht in ausreichender

Menge reduziert und damit aktiviert werden kann. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Anfälligkeit der Erythrozyten gegenüber oxidativem Stress [177]. Plasmodien üben stets auch oxidativen Stress auf ihre Wirtszelle aus. Sind diese nicht ausreichend vor Beschädigung geschützt, werden sie durch Makrophagen aussortiert und mit ihnen die Parasiten. Dadurch kann jedoch eine Malariainfektion auch leichter zu einer lebensbedrohlichen Anämie führen [24]. Gefährlich für Patienten mit einem G6PD(H)-MANGEL ist auch die Therapie mit oxidativen Malariamedikamenten oder Chinin. Aufgrund des massiven Zugrundegehens der Erythrozyten kann es zu *blackwater*-Fieber kommen. Die Niere kommt mit dem Abbau der Massen an freiem Hämoglobin nicht nach, sodass sich der Urin bräunlich-schwarz verfärbt. Auch wenn es in schlimmen Fällen zu Nierenversagen kommen kann, erholen sich die Nieren meistens [46].

1.1.10 *Klinische Symptomatik und Pathophysiologie*

Die Symptomatik der Malaria ist zunächst schwer von einem grippalen Infekt zu unterscheiden. Die Inkubationszeit bei einer Infektion durch *P. falciparum* beträgt 7 bis 15 Tage. Leitsymptome sind Fieber, Kopfschmerzen, Gliederschmerzen und Abgeschlagenheit. Auch Durchfälle können hinzukommen. Bei der durch *P. vivax* und *P. ovale* hervorgerufenen Malaria tertiana, bzw. der durch *P. malariae* verursachten Malaria quartana, können die charakteristischen Fieberintervalle von 48 bzw. 72 Stunden die Diagnose erleichtern. Die Malaria tropica jedoch zeigt kein Wechsel-fieber, da sich *P. falciparum* in seinem Zellzyklus nicht so streng synchronisiert. Bei einer durch *P. falciparum* ausgelösten Malaria und sehr viel seltener bei *P. vivax* kann es zu verschiedenen Komplikationen einer schweren Malaria führen. Die Gefahr besteht vor allem bei erstmaligen oder sporadischen Infektionen [214].

1.1.10.1 *Auslöser des Fiebers*

Verschiedene proinflammatorische Stoffe kommen bei der Ruptur der iRBCs in den Kreislauf. Häm und Hämozoin, beides Abbaustoffe des Hämoglobins, triggern proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 und Tumor Nekrosefaktor [73, 272]. Wird Hämozoin jedoch von Monozyten abgebaut, werden diese in ihrer Funktion gestört und produzieren vermehrt anti-inflammatorische Zytokine. So wird vermutet, dass Hämozoin zu Beginn der Infektion eher einen Fieber fördernden Effekt hat und mit vermehrter Parasitämie und somit verstärktem Untergang infizierter Erythrozyten sich dieser Effekt umkehrt [274]. Einen stark pro-inflammatorischen Effekt haben die Oberflächenantigene MSP und Zircumsporozoiten-Protein (CP) sowie GPIs als deren Ankerprotein in der Parasitenmembran. Als weitere Auslöser wirken Harnsäure als Abbauprodukt der parasitären Nukleotidbasenproduktion, Histon-DNA Komplexe und Exosomen, kleine extrazelluläre Vesikel [63].

1.1.10.2 Schwere Malaria

Die schwere Malaria kommt fast ausschließlich bei Malaria tropica vor. Die WHO definiert eine schwere Malaria über das Vorhandensein einer oder mehrerer der folgenden Symptome [299]:

- eingeschränktes Bewusstsein (einschließlich Koma)
- Erschöpfung welche soweit geht, dass der Patient ohne Hilfe nicht sitzen, stehen oder laufen kann
- mehr als zwei Krampfanfälle innerhalb von 24 h
- schweres Atmen, Atemnot (azidotische Atmung)
- Akutes Lungenödem, akutes Atemnotsyndrom
- Kreislaufzusammenbruch oder Schock
- akute Nierenverletzung
- akuter Ikterus mit Nachweis eines Organversagens
- abnormale Blutungen

Sowie folgende Laborbefunde:

- Hypoglykämie ($< 2,2$ mmol/l)
- metabolische Azidose (Plasmabikarbonat < 15 mmol/l)
- schwere normozytäre Anämie
- Hämoglobinurie
- erhöhte Laktatkonzentration (> 5 mmol/l)
- Nierenfunktionsstörung (Serumkreatinin > 265 μ mol/l)

Eine schwere Malaria ist stets eine akut lebensbedrohliche Diagnose und muss, falls nicht bereits geschehen, zu einem sofortigen Therapiebeginn führen.

1.1.10.3 Zerebrale Malaria

Zerebrale Malaria beschreibt ein Koma im Rahmen einer Malariainfektion. Es ist eine der tödlichsten Komplikationen mit einer Letalität von 15 % bei Kindern bis zu 50 % bei Schwangeren [46]. Dem Koma gehen meist hohes Fieber, Appetitlosigkeit und Erbrechen voraus. Vor und in Folge des Komats kann es zu Krampfanfällen kommen. Die Dauer des Komats ist bei Kindern meist kürzer als bei Erwachsenen (1 d vs. 2–3 d). Der Liquordruck ist bei Kindern meist erhöht, bei Erwachsenen hingegen häufig im Normbereich [298]. Die Pathophysiologie der zerebralen Malaria ist noch

nicht vollständig ergründet. Es scheint jedoch ein multifaktorieller Prozess zu sein, der zu dieser Komplikation führt. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das Verstopfen kleinster Gefäße im Gehirn durch sequestrierte iRBCs und Mikrothromben sowie starke inflammatorische Prozesse in diesen Regionen [225]. Eine entscheidende Rolle scheint dabei der endotheliale Protein C-Rezeptor zu einzunehmen, der durch sequestrierte iRBCs geblockt wird, und seine Thrombin-hemmende Funktion nicht mehr wahrnehmen kann. Somit kommt es zu Fibrinbildung und zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine [185]. Erstaunlicherweise kommt dieser pathologische Mechanismus bei afrikanischen Kindern viel häufiger vor als bei indischen Erwachsenen mit zerebraler Malaria [286]. Zudem kommt es zu Schädigung von Endothelzellen, die zu Hirnödemen führen können. Post-mortem lassen sich frische Myelin- und Axonschädigungen feststellen [72]. 5–30 % der Kinder tragen neurologische Folgeerscheinungen nach einer überstandenen zerebralen Malaria davon. Am häufigsten kommt es zu Epilepsien als Folge dieser Komplikation. Es können jedoch auch Paresen und Sprachstörungen, Wesensveränderungen und andere neurologische Veränderungen verbleiben [298].

1.1.10.4 Anämie

Anämie kann zur Schwere einer Malariaerkrankung beitragen, ist jedoch auch bei unkomplizierten Infektionen eine typische Begleiterscheinung. Wenn auch mit einer im Vergleich zur zerebralen Malaria geringeren Letalität, ist es doch die viel häufigere Komplikation [75]. Während der Erkrankung führt die Sequestrierung der iRBCs bereits zu einem Absinken des Hämatokrits. Später werden infizierte Zellen durch verschiedene Zellen des Immunsystems, darunter vor allem durch cytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen zerstört [224]. Zudem haben Erythrozyten, die in der Milz von einer Infizierung durch *Plasmodien* gereinigt wurden, anschließend eine verkürzte Lebenszeit. Dies hängt mit der Membranveränderung der Erythrozyten durch die Infektion zusammen. Die Zellen werden starrer und daher eher durch mechanische Filtration aus dem Blutkreislauf genommen [188]. Der Abfall des Hämatokrits nach der Infektion ist jedoch so hoch, dass er nicht ausschließlich mit dem Untergang infizierter Zellen zu begründen ist. Die Anzahl der untergegangenen Erythrozyten liegt weit über der Höhe der Parasitämie [166, 205]. Ein möglicher Grund wäre, dass sich Antigene an die Membran nicht infizierter Zellen heften und eine Immunantwort provozieren [112]. Nach Behandlung mit Artemisininen, welche in vielen Ländern als Medikament der ersten Wahl gegen Malaria eingesetzt werden, kann es zu einer sogenannten *late onset* Anämie kommen. Die Ursache hierfür ist jedoch noch unbekannt [211]. Patienten mit G6PD(H)-MANGEL, die ansonsten eine erhöhte Resistenz gegenüber Malaria haben, leiden aufgrund mangelndem Schutzes gegen oxidativen Stress im Falle einer Infektion häufig an schweren Anämien [24]. Als Folge einer Anämie während der Schwangerschaft kommt es häufig zu verringertem Geburtsgewicht der Neu-

geborenen; sowie nach schweren Komplikationen zu Herzfehlern, neurologischen Störungen und Aborten. In Gebieten mit einer hohen HIV-Infektionsrate ist trotz aller Vorsichtsmaßnahmen, eine Bluttransfusion wie sie bei schweren Anämien benötigt werden kann, auch immer mit einem Risiko einer HIV-Infektion verbunden [75].

1.1.10.5 Azidose

Galten bis in die 1990er Jahre Anämie und zerebrale Malaria als die beiden Hauptsyndrome der schweren Malaria, so erkannte man Anfang des neuen Jahrtausends, dass die schwere Malaria einen weitaus komplexeren Syndromkreis ausmacht. Die Azidose wurde als der häufigste Todesgrund und der sicherste unabhängige Vorhersagewert für die Letalität der Krankheit identifiziert [174] [57]. Bei Kindern äußert sich die Azidose durch verstärktes Atmen, meist „Kussmaulatmung“. Auch die Pathophysiologie der Azidose bei Malaria ist noch nicht vollständig durchschaut. Einen wichtigen Anteil trägt das durch den Parasitenstoffwechsel in großen Mengen anfallende Laktat. *Plasmodien* verfügen nicht über alle Enzyme des Citratzyklus und sind daher ausschließlich auf anaerobe Energiegewinnung angewiesen. Das Endprodukt der anaeroben Glykolyse ist das saure Laktat. Fällt es in großen Mengen an und kann nicht mehr in Pyruvat umgewandelt werden, wird das Säure-Basen-Gleichgewicht des Körpers gestört. Die Parasiten produzieren ungefähr die 18-fache Menge an Laktat verglichen mit ν RBC [138]. Einen vielleicht noch stärkeren Beitrag spielt die Laktatproduktion im Gewebe. Aufgrund von mikrovaskulären Obstruktionen und einem niedrigen Hämatokrit wird auch dort vermehrt Energie durch anaerobe Glykolyse gewonnen [79]. Neben dem Laktat tragen auch Ketonkörper, womöglich im Zusammenhang mit krankheitsbedingter Nahrungskarenz [78], und andere organische Säuren [126] Anteil an der Entwicklung von Azidosen.

1.1.10.6 Weitere Komplikationen

Aufgrund des hohen Energiebedarfs der Parasiten kann es bei Kindern und Erwachsenen zu Hypoglykämien kommen. Der Glukoseverbrauch infizierter Erythrozyten ist um ein 50–100faches erhöht [218]. Vor allem Kinder unter drei Jahren und Mangelernährte sind aufgrund geringer Glukosereserven bedroht. Zudem können Krampfanfälle im Zusammenhang mit der Erkrankung mit hohem Glukoseverbrauch in den Muskeln zu einem schnellen Verbrauch der Reserven führen. Im Rahmen einer Chinin-Therapie kann die Insulinproduktion stark ansteigen, sodass auch Erwachsene schnell unterzuckert sind [298]. Organschäden kommen bei Erwachsenen viel häufiger vor als bei Kindern. Eine vorübergehende Leberfunktionsstörung mit Ikterus ist bei Erwachsenen ein recht häufiger Befund. Zu bleibenden Leberschädigung kommt es dabei jedoch nicht [46]. Akutes Nierenversagen und Lungenödeme kommen ebenfalls fast ausschließlich bei Erwachsenen vor [286].

1.1.11 Diagnostik

In Malariaendemiegebieten gehört die Malariadiagnostik zur Routine. Häufig wird bei allen Patient*innen deren Symptome auch nur im geringsten an Malaria denken lassen darauf getestet. In Gebieten, in denen keine Malaria vorkommt, hingegen dauert es häufig lange Zeit bis eine beispielsweise aus dem Urlaub eingeschleppte Malaria diagnostiziert wird. Selbst wenn die Diagnose bedacht wird, bedarf es doch einer gewissen Routine und genügend Zeit, um die Parasiten zu entdecken [280].

1.1.11.1 Mikroskopie

Mikroskopische Blutuntersuchungen sind weiterhin der Goldstandard bei der Malariadiagnostik. Es werden ein sogenannter großer und ein kleiner Tropfen angefertigt. Hierfür wird mit einer Kanüle in die zuvor desinfizierte Kuppe des Zeigefingers oder bei Kleinkindern in die Ferse gestochen. Der erste Blutstropfen wird abgewischt. Der nächste Tropfen wird mittig auf einem Objektträger aufgenommen. Drei weitere Tropfen werden mit etwas Abstand zu dem ersten oder auf einem frischen Objektträger aufgenommen. Der einzelne Blutstropfen wird mit einem im 45° Winkel aufgedrückten Objektträger unter leichtem Druck ausgestrichen. Die drei Tropfen werden vorsichtig zu einem Tropfen mit ca. 1 cm Durchmesser verbunden. Das Blut wird getrocknet und der dünn ausgestrichene Tropfen mit Methanol fixiert. Anschließend werden beide Tropfen in 3–10%iger Giemsa Färbung eingefärbt. Diese setzt sich zusammen aus Eosin und Methylenblau. Eosin färbt das Chromatin der Parasiten rot, Methylen das Cytoplasma der Parasiten blau und die Kerne der Leukozyten dunkelblau bis schwarz. Das „Malariapigment“ Hämozoin wird nicht gefärbt und ist dennoch als bräunliche Ablagerung zu erkennen. Die gefärbten Ausstriche werden bei 100facher Vergrößerung unter dem Mikroskop in Öl-Immersion betrachtet. Der große Tropfen dient als Suchtest. Da die Erythrozyten nicht fixiert werden, sind nach der Färbung nur noch ihre lysierten Hüllen als „Erythrozytenschatten“, Leukozyten und die Parasiten zu sehen [296]. Im dünnen Ausstrich lassen sich die Parasiten differenzieren. Bei *P. falciparum* fällt auf, dass sich fast ausschließlich Parasiten in der Ringform im Ausstrich finden, da die reifen Trophozoiten sequestrieren und kaum im peripheren Blut sind. Die feinen Ringe haben teilweise zwei Chromatinpünktchen. Hämozoin ist bei älteren Ringen als charakteristische „Maurer’sche Fleckung“ im Cytosol der Erythrozyten zu erkennen. Die geschlechtlichen Parasiten haben bei *P. falciparum* eine charakteristische Bananenform. [56, 273].

Ein wenig sensitiver als der periphere Blutausstrich, haben sich intradermale Blutausstriche erwiesen. Zudem finden sich hier mehr reife Formen von *P. falciparum*, die sonst an den Gefäßwänden sequestriert sind. Mit einer feinen Kanüle werden mehrfach kleine Stiche auf der volaren Seite des Unterarms gesetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass lediglich oberflächlich in die Dermis und nicht in

weiter unten liegende Hautschichten gestochen wird. Das nun langsam herausickernde Blut kann nun mit einem Objektträger aufgefangen und wie ein peripherer Blutausschlag gefärbt und betrachtet werden [242].

1.1.11.2 Schnelltests

In Regionen, in denen die Malariadiagnostik zur Alltagsroutine gehört, helfen Antikörper-Schnelltests beim Nachweis von Parasiten im Blut. Neben der einfachen Bedienung und der Geschwindigkeit ist ein weiterer Vorteil, dass für diese Art der Diagnostik weder Mikroskop noch Labor benötigt werden. Da somit quasi überall auf der Welt eine adäquate Diagnostik sichergestellt werden und die Fehlbehandlung von falsch diagnostizierten Malariafällen als bedeutender Beitrag zur Resistenzentwicklung reduziert werden kann, gilt der Schnelltest inzwischen als wichtiges Instrument zur weltweiten Eindämmung der Malaria [98]. 2016 wurden schätzungsweise 312 Millionen dieser *rapid diagnostic tests* (RDTs) verkauft [302]. Die Tests sind für die Identifikation einer oder mehrerer *Plasmodium*-Spezies ausgelegt. Die Detektion verläuft über spezifische Antikörper gegen das histidinreiche Protein 2 (*PfHRP2*), verschiedene Laktatdehydrogenasen oder Aldolase. Eine Blutprobe wird dafür auf den Tester gegeben und die Erythrozytenmembran mit einer Pufferlösung gelöst, sodass möglichst viele Parasitenantigene frei vorliegen. Der Puffer enthält zudem markierte Antikörper. Die im Puffer gelösten Antigene diffundieren zusammen mit den markierten Antikörpern, entlang eines Nitrozellulosestreifens. Dabei passieren sie eine Linie gebundener Antikörper die über die Bindung an ein *Plasmodium*-Antigen die markierten Antikörper binden können. Eine weitere Linie mit gebundenen Antikörpern, welche die markierten Antikörper direkt binden kann, dient als Kontrolle. Gebundene Antikörper sind mit bloßem Auge als Linie zu erkennen. Ist nur die Kontrolllinie zu erkennen, ist der Test negativ. Sieht man beide Linien, ist er positiv. Ist die Kontrolllinie nicht zu sehen, ist der Test ungültig [297]. Eine Gendelektion der Proteine *PfHRP2* und *PfHRP3* verhindert die Identifikation mit vielen RDTs und generiert falsch-negative Testergebnisse [91]. Die Ausbreitung dieser Mutation gilt daher als Gefahr bei der Eindämmung der Malaria [301].

1.1.11.3 Weitere Diagnostika

Mit Hilfe der PCR-Sequenzierung von amplifizierter Parasiten-DNA kann auch bei sehr geringer Parasitämie die Spezies sicher bestimmt werden. Auch zeitgleiche Infektionen mit mehreren Spezies können mittels dieser Technik nachgewiesen werden [248]. Zudem können mittels PCR, Resistenzen bestimmt werden, insofern diese auf Grund bekannter Mutationen entstehen. So kann zum Beispiel die Mutation *pfert* T76 als Marker für Chloroquin-Resistenz genutzt werden [67]. Eine Mutation auf *pfmdr* 1 scheint mit Resistenz gegen Artemisinin-Therapien im Zusammenhang zu stehen [127].

Als Diagnostikum kann bei der zerebralen Malaria die Fundoskopie eingesetzt werden. Neben einer prognostischen Aussage lässt sich über Erscheinung und Ausmaß einer Retinopathie zwischen einem malariabedingtem Koma und Differentialdiagnosen unterscheiden [23]. Alternativ kann auch Elektroencephalographie (EEG) sowohl bei der prognostischen Diagnostik als auch zum Ausschluss von Differentialdiagnosen genutzt werden [264].

1.1.12 Malariatherapie

Die Grausamkeit der Malaria bekamen in ihrer vollen Härte stets die Menschen zu spüren, die aus der Fremde in ein Endemiegebiet kamen. Die ansässige Bevölkerung war ja dank Praemunität und Resistenz weitgehend geschützt und selbst wenn jedes zehnte Kind an der Malaria verstorben wäre, so war das in Zeiten hoher Kindersterblichkeit nicht augenscheinlich mit der Malaria zu verknüpfen. Ganz anders, wenn große Gruppen von Auswärtigen in eine Malariaregion kamen. Sie starben reihenweise alle an den selben Symptomen. Hier war ein Zusammenhang nahe liegend. So ist es kein Wunder, dass die Entwicklung vieler Malariamedikamente ihren Ursprung in der Kolonialisierung bzw. der Kriegsführung in der Fremde hatten. Zu keiner anderen Situation in der frühen Menschheitsgeschichte kamen so viele nicht resistente Menschen auf einmal plötzlich in Endemieregionen. Der zweite Kreuzzug wurde abgebrochen, nachdem Konrad III und ein großer Teil seiner Armee an Malaria erkrankt waren. Der römisch-deutsche König starb kurz darauf an der Malaria tertiana. Auch während des dritten Kreuzzuges starben bei der Belagerung von Akkon wohl mehr nordeuropäische Kreuzfahrer an der Malaria als bei Kampfhandlungen [281].

1.1.12.1 Chinin

So ist es nicht verwunderlich, dass das erste Malariamedikament, das in Europa bekannt wurde aus der *Conquista*, der Eroberung und Kolonialisierung des südamerikanischen Kontinents durch die Spanier stammt. Es ist nicht sicher, ob die Malaria schon vor der Ankunft der Spanier in Amerika ansässig war, das Tropenklima bot jedoch ideale Bedingungen zur Ausbreitung der Krankheit. Indigene nutzten heiße Aufgüsse der Rinde des Chinchonabaums, der mit seiner Wirkung als Muskelrelaxans Linderung von Schüttelfrost-Anfällen bei Fieberschüben gewähren sollte. Über spanische Missionare wurde die „Jesuitenrinde“ nach Europa gebracht, wo sie sich zunächst wegen ihrer Bitterkeit schwer durchsetzen konnte. 1820 isolierten Pelletier und Caventou den Wirkstoff Chinin aus der Rinde, was die Dosierbarkeit des Medikaments ermöglichte [200]. Aufgrund der bestechenden Wirksamkeit auch zur Prävention einer Malariainfektion und indem man es den Soldaten durch Beimischung von Gewürzen und Gin oder anderen Alkoholika schmackhaft machte, setzte sich Chinin nun langsam durch und half bis in das zwanzigste Jahrhundert

hinein bei der Kolonialisierung des südlichen Kontinents durch die malariaanfälligen Europäer [101]. Chinin ist ein Alkaloid; es ist leicht basisch. Neben seiner Wirkung als Malariamedikament wird es als Bitterstoff in der Lebensmittelchemie verwendet. Seit Mitte des 19. Jahrhunderts wird nach einer Möglichkeit gesucht, Chinin künstlich herzustellen. Obwohl Woodward und Doering dies 1940 schließlich gelang, wird heute noch der größte Teil des Chinins aus Chinchona-Rinde gewonnen [143]. Nachdem Chinin lange Zeit durch synthetisch hergestellte Präparate fast vollständig verdrängt war, auch wegen des Zusammenhangs mit *blackwater*-Fieber (Unterabschnitt 1.1.9), erlebt es in letzter Zeit eine gewisse Renaissance. Es gilt als Medikament der Wahl bei Schwangeren im ersten Trimester und als Alternativmedikation, wenn die teureren Artemisinine nicht verfügbar sind. Chinin kann oral, über eine Infusion oder als intramuskuläre Injektion gegeben werden [299]. Es wirkt schizontozid und bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium malariae* auch gametozytizid, jedoch nicht bei *P. falciparum* [2]. Der genaue Wirkungsmechanismus ist bis heute jedoch noch nicht verstanden [46][36]. Chinin ist im Vergleich zu anderen Präparaten recht arm an schwereren Nebenwirkungen, es kann aber zu einem charakteristischen reversiblen Symptomkomplex aus Tinnitus, Schwindel, Verstimmung und Erbrechen kommen [46]. Mefloquin, wie das Chinin ebenfalls ein Chinolinmethanol, war lange Zeit als Prophylaxemedikation beliebt, ist jedoch in den letzten Jahren wegen starken neurotoxischen Nebenwirkungen immer stärker in die Kritik gekommen [209].

1.1.12.2 Chloroquin

Auch die Entwicklung der ersten synthetisch hergestellten Malariamedikamente wurde durch Kriege angetrieben. Während des ersten Weltkrieges erlitten die deutschen und österreich-ungarischen Armeen herbe Verluste durch Malariaepidemien in Griechenland und Nordafrika. Die weltweiten Chinchona-Plantagen waren unter Kontrolle der Entente und ihrer Alliierten. Noch während des ersten Weltkrieges, aber vor allem nach Machtergreifung durch die NSDAP, wurde in Deutschland die Suche nach einem alternativen Präparat ohne Abhängigkeit von der tropischen Ressource Chinchona intensiv vorangetrieben [231]. Aus diesem Programm entstanden 1930 Mepacrin, das während des Krieges hauptsächlich von den US-Amerikanern genutzt wurde, Sontochin und schließlich durch Hans Andersag, Chloroquin, das bei ersten Versuchen als „zu giftig für die praktische Anwendung am Menschen“ angesehen wurde und erst nach Übernahme der Bayer AG durch die Amerikaner nach dem Krieg seine Erfolgsgeschichte begann [44, 152]. Das beste Argument für den Einsatz von Chloroquin ist sein Preis (Chloroquin (Base) 150 mg Tabletten im Durchschnitt 2015: 0,0137 USD pro Stück [175]). Aus diesem Grund und wegen seiner guten Wirksamkeit setzte es sich in der zweiten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts auf der ganzen Welt als das Malariamittel der ersten Wahl durch. Der enorme Erfolg der Therapie führte in den 1950er Jahren zu der Hoffnung, Malaria

komplett eradizieren zu können. Doch schon zu Ende des Jahrzehnts entwickelten sich bei *P. falciparum* Resistenzen gegen Chloroquin. Zunächst nur auf einige Regionen beschränkt, breiteten sich die Resistenzen in den nächsten 40 Jahren über die ganze Welt aus [288], sodass der Wirkstoff heute nur noch in einigen Ländern Südamerikas und des Mittleren Ostens als Mittel der Wahl eingesetzt werden kann [300]. Heute noch gilt Chloroquin als Mittel der Wahl gegen *P. vivax*-Malaria. Doch auch bei dieser Spezies sind in den letzten Jahren vermehrt Resistenzen in Süd-asien und Südamerika aufgetaucht [206]. Global liegt hier das Resistenzniveau bei unter 5 %, jedoch mit Spitzen von bis zu 62 % in Malaysia [302]. Chloroquin reichert sich in der Nahrungsvakuole der Parasiten an und wirkt ausschließlich auf „sich ernährend“ Hämoglobin degradierende Stadien. Es interferiert mit der Fähigkeit von *Plasmodium* Häm in Hämozin umzuwandeln. Das angereicherte Häm wirkt toxisch auf den Parasiten und führt so zu seinem Untergang. Der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch ebenfalls noch unbekannt. [84]. Resistenzen gegen Chloroquin entstehen über einzelne Punktmutationen. Sie können nicht auf andere *Plasmodien* übertragen werden. Das bedeutet Resistenzen entstehen stets lokal und breiten sich durch den Selektionsvorteil, den sie durch die Mutation erlangt haben, langsam aus. Während Monotherapien die Ausbreitung von Resistenzen jahrelang begünstigt haben, scheinen sich die resistenten Stämme auch noch Jahre nach der Umstellung der Medikamente weiter durchzusetzen. [194][84]. Chloroquin ist relativ nebenswirkungsarm. Es kann jedoch vor allem bei Menschen mit dunkler Hautfarbe zu Pruritus kommen. Der starke Juckreiz wirkt sich verständlicherweise negativ auf die Bereitschaft aus, therapeutische Vorgaben zu befolgen. Bei Einnahme über lange Zeiträume z.B. zur Prävention über fünf Jahre kann es zur irreversiblen Schädigung der Netzhaut kommen [46].

1.1.12.3 Artemisinin

Artemisin oder *Qīnghāo* ist das wohl am längsten bekannte Antimalariamittel. Die älteste Erwähnung findet sich in der Schrift „52-Verschreibungen“ aus dem zweiten Jahrhundert vor unserer Zeit. Eine Beschreibung zur Anwendung bei Malaria liefert das Buch „Notfälle und Verschreibungen“ des chinesischen Autors Ge Hong, der in den Jahren 284–346 lebte. Gewonnen wird es durch kalte Extraktion aus den Blättern des einjährigen Beifußes *Artemisia annua* [269, 283]. Das Medikament der traditionellen Medizin geriet in Vergessenheit. Erneut führte militärische Forschung zu seiner Wiederentdeckung. Im Vietnamkrieg unterstützten nordvietnamesische Truppen die *Nationale Front für die Befreiung Südvietnams (Việt cộng)*. Während der Norden Vietnams malariafrei ist, sind die südlichen Gebiete sowie die Grenzregion nach Kambodscha, durch die die militärische Versorgungslinie (der sogenannte Ho Chi Minh Pfad) führte, *P. falciparum*-Regionen [300]. Zudem hatten sich Chloroquin-Resistenzen in dieser Region schon in den 60er Jahren von Thailand her ausgebreitet [49]. Der vietnamesische Präsident Hồ Chí Minh bat daher die chi-

nesische Regierung, die Forschung nach möglichen Wirkstoffen gegen Malaria zu intensivieren. Das „Projekt 532“ stieß nach Untersuchung von über 2000 traditionellen Heilkräutern 1971 auf *Qīnghāo* und schließlich, über das Studium alter Texte auf den Wirkstoff Artemisinin oder *Qīnghāosù*. Dieser stellte sich als das am schnellsten wirksame aller bis dato entdeckten Präparate gegen die Blutstadien der *Plasmodien* heraus [269, 291]. 2015 erhielt die Wissenschaftlerin Youyou Tu, Entdeckerin des Artemisinins, den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin „für ihre Entdeckungen betreffend einer neuartigen Therapie der Malaria“ [191]. Entscheidend für die Wirksamkeit des Artemisinins ist seine Peroxid-Untereinheit. Diese zerfällt, induziert durch das Fe(II) des Haem im Parasiten, zu freien Radikalen. Neben den direkten oxidativen Schäden, die durch diese Radikale verursacht werden, wird eine direkte hemmende Wirkung auf spezifische Adenosintriphosphatasen (ATPASEN) (z.B.: PfATPase6, SERCA) des Parasiten diskutiert [36]. Artemisinine gelten zur Zeit als die am besten wirksamen Antimalariapräparate. Sie senken das Mortalitätsrisiko gegenüber dem Einsatz von Chinin um über 20 %. Auch das Risiko einer zerebralen Malaria sowie das von epileptischen Anfällen und Hypoglykämien fällt mit Artemisininen geringer aus [69]. Artemisinin-derivate haben sehr geringe Nebenwirkungen. In seltenen Fällen kommt es zu allergischen Reaktionen. Aufgrund der oxidativen Wirkung der Artemisinine sollten sie ebenfalls nicht bei Patienten mit G6PD(H)-MANGEL eingesetzt werden [261]. Inzwischen tauchen lokal bereits Resistenzen gegen einzelne Artemisinin-derivate auf. Die WHO hat daraufhin dazu aufgerufen, die Nutzung von Monopräparaten einzustellen. Die heutige Therapie der Wahl sieht in den meisten Ländern eine *Artemisinin-Based Combination Therapy* (ACT), die Kombination von Artemisininen mit einem weiteren Wirkstoff, vor. Bei der ACT werden unter anderem eingesetzt: Artemether, Artesunat und Dihydroartemisinin; in Kombination mit: Lumefantrin, Amodiaquin, Mefloquin oder Piperaquin [299].

1.1.12.4 Weitere Medikamentengruppen

Für die Therapie der *P. vivax* induzierten Malaria sind die 8-Amino-quinoline von großer Bedeutung, da sie als einzige Präparate gute Wirksamkeit gegen Leberschizonten und die für die chronische Malaria tertiana verantwortlichen Hypnozoiten in der Leber zeigen. Präparate dieser dem Chloroquin ähnlichen Wirkstofffamilie sind: Primaquin, Tafenoquin und Bulaquin [299]. Das als Kombipräparat erhältliche Atovaquon-Proguanil wird vor allem als Prophylaxe auf Reisen genutzt. Es kann jedoch auch als Notfallmedikament bei milder Malaria eingesetzt werden, wenn andere Medikamente nicht erhältlich sind. Doxycyclin, eine Tetracyclin-Antibiotikum, kann ebenfalls zur Prophylaxe genutzt werden. Vorteilhaft ist die hohe Wirksamkeit des Breitbandantibiotikums gegen viele andere Erreger von Tropenkrankheiten. Von Nachteil bei tropischem Sonnenschein sind die möglichen phototoxischen Nebenwirkungen der Tetrazycline [88]. Zudem wirkt die Tatsache, dass Doxycyclin als

hochwirksames und sehr günstiges Medikament [175] gerade in ärmeren Ländern einen hohen Stellenwert in der Therapie vieler Krankheiten einnimmt, die Frage auf, ob ein Einsatz als Prophylaxe und das damit entstehende Risiko der Bildung resistenter Bakterien, ethisch vertretbar ist solange es Alternativen gibt.

1.1.13 Vektorkontrolle

Neben der bereits besprochenen Chemoprophylaxe, die eine Manifestation der Infektion unterbindet, bietet die sogenannte Vektorkontrolle Prävention durch direkten Schutz vor den infektiösen Stichen. Die Kontrolle kann dabei durch Abhalten oder durch Vernichten des Vektors geschehen. Als historisches Beispiel effektiver Vektorkontrolle können Maßnahmen beim Bau des Panamakanals angesehen werden. 1881 begann die französische Kanalkompanie, motiviert durch den Erfolg des 12 Jahre zuvor fertiggestellten Suezkanals, mit dem Durchstich des Isthmus von Panama. Man beachte, dass Ross die Mosquito-Vektor-Theorie erst fast 20 Jahre später aufgestellt und bewiesen hat (vgl. [Unterabschnitt 1.1.2](#)). Bei dem achtjährigen Versuch des Kanalbaus verlor die Gesellschaft 240 von 1000 Arbeiter*innen pro Jahr durch Malaria und Gelbfieber Infektionen. Als die Vereinigten Staaten von Amerika 1902 mit dem Bau fortfuhren, war die *Anopheles*-Mücke als Malariavektor bereits bekannt. Es wurden daher in großem Rahmen Brutstätten der Mosquitos ausgetrocknet, nicht drainierbare Wasserreservoirs mit Ölen bedeckt, Häuser ausgeräuchert und die Schlafsäle der Arbeiter*innen mit Mosquitonetzen ausgestattet. Mit Hilfe dieser Maßnahmen konnten gegen Ende der Bauarbeiten die Gelbfieberinfektionen komplett unterbunden werden und die Zahl der Malariaerkrankungen drastisch gesenkt werden. Die Rate der an Infektionskrankheiten Verstorbenen, sank auf 7–8 von 1000 Arbeiter pro Jahr. Dies verhalf schließlich zur Fertigstellung des Mamutprojekts Panamakanal [16].

1.1.13.1 Dichlorodiphenyltrichloroethan

Die große Ära der Vektorkontrolle begann mit dem massiven Einsatz von Dichlorodiphenyltrichloroethan (DDT) ab Mitte der 1940er Jahre. Ganze Regionen und Inseln wurden von Flugzeugen aus mit dem Insektizid besprüht. DDT wirkt als Nervengift gegen Insekten. Die Dauerpolarisation spannungsbedingter Na^+ -Kanäle führt zu Lähmung und schließlich zum Tod der Insekten. Als Xenoöstrogen hat DDT außerdem eine endokrine Wirkung und kann in größeren Konzentrationen zu Reproduktionsstörungen führen. Die Chlorkohlenwasserstoffe reichern sich im Fettgewebe an und erreichen in der Umwelt eine sehr hohe Halbwertszeit von über 10 Jahren. In den Hochzeiten der Nutzung gelangten bis 2 Millionen Tonnen des Insektizids in die Umwelt. Dies führte aufgrund der lipophilen Eigenschaften und der relativ hohen Halbwertszeit zu Durchschnittswerten von bis zu 20 mg/kg im menschlichen Fettgewebe [4, 29]. Während der toxikologische Effekt auf den Men-

schen gering ist, hatte der massive Einsatz von DDT, starke Auswirkungen auf die weltweiten Fisch und Raubvögelbestände. Bei letzteren spielte die Abnahme der Eierschalendicke eine große Rolle für den Rückgang der Populationen. Daher wurde die Nutzung von DDT 1970 in den meisten Ländern stark eingeschränkt oder DDT nur noch bei Malariaausbrüchen zur Vektorkontrolle zugelassen [270, 293]. Im Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe, wurde der Einsatz von DDT in Form eines völkerrechtlichen Vertrags reguliert. Die in Ausnahmefällen zugelassene Nutzung muss seither an die Vereinten Nationen gemeldet werden [263]. 2006 gab die WHO in einem Positionspapier die Empfehlung für die Nutzung von DDT im Rahmen von *indoor residual spraying* (IRS) heraus. Hierbei werden die Wände von Wohnräumen mit Insektiziden imprägniert, sodass sich darauf niederlassende Insekten absterben. Die Anwendung in diesem begrenzten Rahmen wurde als unproblematisch dargestellt, da das DDT nicht in die Umwelt gelange. Die angewandten Mengen seien auch nicht schädlich, für die sich in den Räumen aufhaltenden Personen [295]. Diese Einschätzung wurde zum Teil kritisch gesehen, da eine kanzerogene Wirkung, vermehrtes Auftreten von Diabetes sowie Entwicklungsstörungen im Zusammenhang mit DDT nicht ausgeschlossen werden können [80]. Schon in den 1970er Jahren traten DDT-resistente *Anopheles*-Mücken auf. Auch mangelnder Komfort in der Handhabung, hat dazu geführt das DDT für IRS durch andere Präparate, wie Carbamate oder Pyrethroide (vgl.: [Unterabsatz 1.1.13.2](#)), ersetzt wurde. Beklagt wurde unter anderem, dass DDT Flecken an den Wänden hinterlässt und andere Insekten wie Schaben nicht tötet, sondern ihre Aktivität sogar erhöhe [53]. Im Jahr 2014 wurde DDT nur noch in 8 Ländern eingesetzt [300].

Ein aktuell in den Medien viel zitiertes Review, schätzt den jährlichen Rückgang der Insektenpopulationen aktuell weltweit auf 2,5 % pro Jahr. Die Autoren sehen momentan die Bedrohung eines Aussterbens von 40 % aller Insektenarten. Es ist schwer auszumalen wie sich diese Massenextinktion der meistverbreiteten und für das Funktionieren nahezu aller Ökosysteme unentbehrlichen Spezies auf die Weltgesundheit auswirken wird [247]. Wenn auch diese Entwicklung zu größten Teilen auf klimatische Veränderungen und den Pestizideinsatz in der modernen Agrarindustrie zurückgeführt wird, ist der ungezielte und großflächige Einsatz von langlebigen Insektiziden – im Sinne *Primum non nocere* – in diesem Kontext noch kritischer zu Betrachten.

1.1.13.2 Imprägnierte Mückennetze

Die gravierenden ökologischen Folgen der großflächigen Anwendung von Insektiziden sowie die Verstärkung der Ausbreitung von Resistenzen durch diese Technik haben ein Umdenken bewirkt. Neben dem IRS gilt der Einsatz von imprägnierten Bettnetzen (ITNs) heute als wichtigster Pfeiler der Vektorkontrolle. Hintergrund ist, dass Mosquitos überwiegend nachtaktiv sind, die Mehrzahl der infektiösen

Stiche also während des Schlafs erfolgen. Der schlafende Mensch unter dem Netz wirkt durch die Expiration von Kohlendioxid wie ein Köder auf die Mosquitos, die dann nach Berührung des Gewebes an dem Mückennetz verenden. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit des Kontakts mit dem Insektizid gegenüber IRS. Dort müssten sich die Stechmücken erst an die Wand setzen, um mit dem Gift in Kontakt zu kommen. Von Nachteil ist der mangelnde Komfort der Netze vor allem während der heißen Jahreszeiten, der zu verminderter Compliance führt. Auch müssen die Netze in gutem Zustand gehalten und Löcher ausgebessert werden. Daher erfordert der Einsatz von ITN auch stets die Unterweisung der Bevölkerung in der korrekten Handhabung [54]. Die Netze werden meist mit Pyrethroiden (z.B. Permethrin) imprägniert. Pyrethroide reichern sich im Gegensatz zu DDT nicht in der Umwelt an. Sie gelten als wenig toxisch, können aber allergische Hautreaktionen hervorrufen. Wie DDT wirken sie auf spannungsbedingte Na⁺-Kanäle [4]. Bei den neueren *long-lasting insecticidal nets* (LLIN) ist das Insektizid in die Fasern der Netze eingewoben, bzw. an sie gebunden. Dadurch soll die insektizide Wirkung über 3 Jahre anhalten und mehrere Waschgänge überstehen, ohne dass das Netz neu imprägniert werden muss [179]. Generell nimmt bei allen Formen von Mückennetzen die Wirksamkeit vor allem durch häufiges Waschen ab. Auch bei LLIN ist die Wirksamkeit nach 15 Waschgängen schon um bis zu 51% reduziert. Die Art wie die Netze getrocknet werden, spielt ebenfalls eine Rolle (Aufgehängte Netze verlieren mehr Wirkstoff als auf dem Boden getrocknete). Der Einfluss von Sonnenlicht, welches theoretisch die essentiellen Doppelbindungen des Wirkstoff zerstört, wirkte sich in praktischen Untersuchungen signifikant weit weniger deutlich als das Waschen aus [15, 144, 145]. Die Kombination von IRS und ITN/LLIN ist nur sinnvoll, wenn Präparate mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen genutzt werden. Andernfalls kann die Kombination sogar in einer Erhöhung der Infektionswahrscheinlichkeit resultieren [193]. Im subsaharischen Afrika schliefen 2015 schätzungsweise 55 % der Bevölkerung in Gebieten mit Infektionsrisiko unter einem ITN/LLIN. 15 Jahre zuvor waren es noch unter 2 %. Die WHO schätzt, dass durch den Einsatz von ACT, IRS und ITN/LLIN zwischen 2000 und 2015 über 250 Millionen Malariaerkrankungen verhindert wurden. Die Gesundheitsökonomischen Ersparnisse schätzt sie auf über 900 Millionen USD, von denen 68 % auf die imprägnierten Netze zurückgingen [300]. In den letzten Jahren traten in 58 von 72 Ländern mit Malaria Resistenzen gegen Pyrethroide auf. Hinsichtlich der enormen Bedeutung der ITNs in der Eindämmung der Krankheit ist es nicht verwunderlich, dass die WHO in ihrem jüngst gestartetem „*threat map*“-Projekt das Aufkommen der Resistenz als eine der drei großen Herausforderungen bei der Kontrolle und Eliminierung aufführen [301].

1.1.13.3 Weitere Mittel zur Vektorkontrolle

Für den individuellen Schutz wird das Tragen langer Kleidung nach Einbruch der Dunkelheit empfohlen. Der Aufenthalt in klimatisierten Räumen ist ebenfalls ein

wirksamer Expositionsschutz. Als absolut ineffektiv haben sich hingegen elektrische Insektenfallen mit Lichtquelle als Köder erwiesen, da weibliche Stechmücken sich an ausgeatmetem Kohlendioxid und nicht an künstlichen Lichtquellen orientieren. [87]. Guten individuellen Schutz bieten Repellentien. Häufigste wirksame Bestandteile dieser als Spray, Aerosol oder Creme erhältlichen Mückenschutzmittel sind, N,N-diethyl-3-methylbenzamid (DEET), Citronella und Mischungen aus Soja-, Geranien- und Kokosölen. Die Wirkungsdauer ist konzentrationsabhängig, bildet jedoch bei hohen Konzentrationen ein Plateau. Die Wirkungsdauer von DEET kann durch Polymerisierung des Wirkstoffes verlängert werden. DEET gilt als gut verträglich. In seltenen Fällen treten allergische Hautreaktionen v.a. in den Ellenbeugen auf. Für die normale Anwendungen sind Konzentrationen bis zu 35 % ausreichend. Für Kinder werden Konzentrationen von maximal 10 % empfohlen. Permethrin-Sprays werden zur Anwendung auf Kleidung angeboten. Diese halten Mosquitos nicht ab, sondern lähmen oder töten diese bei Kontakt mit der Kleidung [85]. Theoretisch müssten Repellentien als Ergänzung zu IRS und ITN/LLIN, die ja die Insekten nur im Haus bzw. im Bett abhalten, das Infektionsrisiko weiter senken. Die Ergebnisse entsprechender randomisierte Studien fallen jedoch gemischt aus, sodass ein wirklicher Effekt des großflächigen Einsatzes von Repellentien in Populationen unsicher bleibt [62, 226, 244].

1.2 DIE POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATION O-GLCNAC

1.2.1 Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen (PTMs) finden, wie der Name bereits sagt, nach der Translation der mRNA zu Proteinen statt und sind somit nicht DNA-kodiert. Auf spezifische Stellen können kleine Peptide, Lipide, Kohlenhydratverbindungen oder andere Stoffe übertragen werden. Sie tragen einen großen Anteil an der Entstehung, jedoch auch der Komplexität, der Proteomvielfalt. Über 400 Posttranslationale Modifikationen sind heute bekannt, von denen viele erst in den letzten 10 Jahren entdeckt wurden [164]. Sie können u. a. die Expression, Lokalisation und sogar die Funktion von Proteinen bestimmen bzw. beeinflussen. Unter anderem ermöglichen PTM Organismen, die Anpassung an sich verändernde Bedingungen, sowohl akut als auch epigenetisch vererbt [207]. Die Fähigkeit der schnellen Anpassung benötigt *P. falciparum* sowohl beim Wirtswechsel, als auch bei der Entwicklung von Resistenzen gegen gängige Medikamente. Der enzymvermittelte Prozess der kovalenten Phosphorylierung [40], Glykosylierung, Hydroxylierung, Oxidierung, Ubiquitinylierung [256][306], Acetylierung [213] oder die Übertragung von GPI-Ankern [254] sind nur einige wenige Beispiele solcher Modifikationen .

1.2.2 Glykosylierung

Glykosylierung beschreibt die kovalente Bindung von Glykanen (Monosaccharide oder Polysaccharide) an Proteine, Lipide oder andere Stoffe. Die Variabilität der hierfür als Baustein dienenden Monosaccharide ist sehr hoch. Zudem können acetylierte Aminreste angehängt, Hydroxygruppen abgespalten oder oxidiert sein. Weiterhin können die Monosaccharide untereinander, in α - (cis) oder β -Konfiguration theoretisch zwischen allen Hydroxygruppen verbunden sein. Auch wenn der größte Teil dieser möglichen Verbindungen in der Natur nicht vorkommt, erweitert die Glykosylierung die Komplexität und Diversität biologischer Systeme enorm. Bei klassischen Glykoproteinen werden die Glykane im Lumen des *Endoplasmatischen Reticulums* (ER), *N*-glykosidisch an Asparagin, oder im Golgi Apparat *O*-glykosidisch an Serin oder Threonin gebunden. Die Glykosylierung der Proteine kann deren korrekte Faltung und Lokalisierung sowie ihre Stabilität und Löslichkeit sicherstellen; oder ein wichtiger Faktor der eigentlichen Funktion von Proteinen sein. Zum Beispiel als Teil der Glykokalix, als Signalsequenz bei Zell-Zell-Interaktionen, oder als wasserbindender Anteil der Mucine der Schleimhaut und des Bindegewebes. Lange Jahre galt das Dogma, Glykoproteine seien ausschließlich extrazellulär oder im Lumen intrazellulärer Organellen zu finden. Zudem wurden sie im Gegensatz zur Phosphorylierung, die dynamisch transferiert und hydrolysiert wird,

als eine statische Modifikation der Proteine angesehen. Mit der Entdeckung des O-GlcNAcs musste diese Ansicht radikal revidiert werden [275].

1.2.3 *N-Glykosylierung*

N-Glykosylierung beschreibt die Verknüpfung teilweise sehr komplexer und verzweigter Glykane mit der Aminogruppe (*N*-) von Asparagin des Proteins. Der Biosyntheseweg ist bei nahezu allen mehrzelligen Spezies vorhanden und hochkonserviert. Bei Prokaryonten findet die *N*-Glykosylierung im Periplasma an der Plasmamembran statt. Bei Eukaryonten erfolgt die Synthese einer Polysaccharidstruktur an Dolichol-Phosphat (DOL-P) auf der äußeren Membran des ER. Als erster Baustein wird hier GlcNAc übertragen. Als Donor dient UDP-GlcNAc, das Endprodukt des Hexosamin-Biosyntheseweg, welches ebenso Donor der *O*-GlcNAcylierung ist. Von DOL-P wird der als Grundgerüst dienende einheitliche Polysaccharidbaum, die sogenannte core-Region, auf der ER-Innenseite schließlich auf Asparagin übertragen. In weiteren Schritten werden im Golgi Apparat Glykane abgespalten und angehängt. Die so synthetisierten Glykoproteine werden bei Eukaryonten entsprechend ihrer Komplexität als High-Mannose hybrider oder komplexer Typ bezeichnet (vgl. [Abbildung 3](#)). Sie nehmen wichtige Funktionen in der Zell-Zell-Interaktion ein [253]. Bei *P. falciparum* spielt diese Art der *N*-Glykosylierung praktisch keine Rolle. In Studien konnte lediglich die Bindung von einem beziehungsweise zwei GlcNAc Molekülen nachgewiesen werden. Eine Studie beschreibt zudem zwei größere Komplexe mit GlcNAc und mehreren Manose Molekülen. Komplexe Zuckerbäume wie sie bei anderen Spezies bekannt sind kommen bei *P.falciparum* jedoch nicht vor [173].

1.2.4 *O-Glykosylierung*

Im Gegensatz zur *N*-Glykosylierung sind *O*-Glykane nicht an Asparagin, sondern *O*-glykosydisch an Serin oder Threonin gebunden. Gebildet werden sie initial im Golgi Apparat meist mit einem N-Acetylgalactosamin (GALNAC) als primär gebundenen Aminosucker. Auf diesen werden durch die Übertragung von Galaktose, Mannose, Fucose, N-Acetylglucosamin (GLCNAC) und N-Acetylneuraminsäure (NEUNAC) einfache bis hochkomplexe Polysaccharidstrukturen aufgebaut. Bis auf letztgenanntes können diese Zucker und Aminosucker jedoch auch als Basis der *O*-Glykosylierung dienen. Als Mucine nehmen die *O*-Glykane eine Barrierefunktion ein. Zudem wirken sie als Signalstrukturen und Antigene. Eines der prominentesten Beispiele für *O*-Glykosylierung sind die Blutgruppenantigene. Die Blutgruppen des ABO-Systems unterscheiden sich lediglich dadurch, dass an das H-Antigen der Blutgruppe Null ein einzelnes Glykan (GalNAC bei A bzw. Galaktose bei B) angehängt wird. [252] Es ist beeindruckend, wie diese scheinbar minimale Unterscheidung im

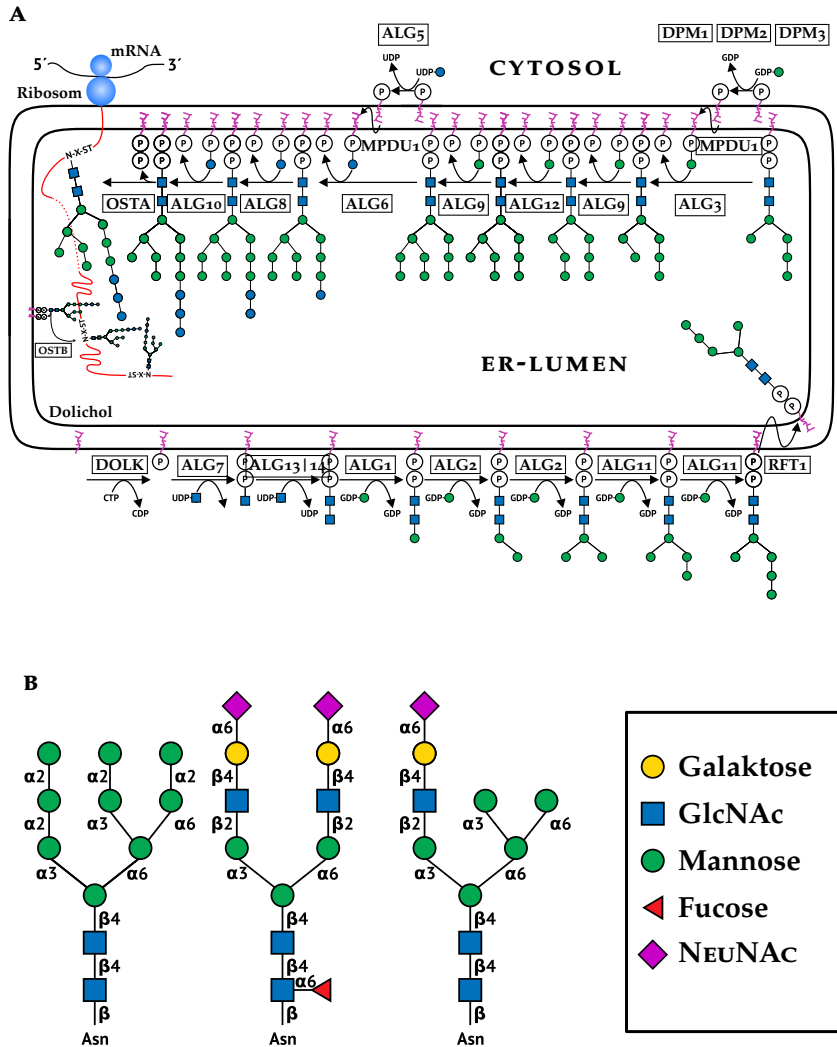


Abbildung 3: N-Glykosylierung

a) Schema der N-Glykosylierung im eukaryontischen ER:

Die Dolicholkinase (DOLK) phosphoryliert Dolichol an der Cytosolseite des ER zu DOL-P. Nun wird die Basis des Polysaccharidbaumes durch die Alpha-Glucosyltransferasen (ALGs) synthetisiert. Nach der Übertragung von drei GlcNAc und fünf Mannosen wird das Grundgerüst durch RFT1 nach luminal geflippt. Hier wird die Synthetisierung fortgeführt. Die Glykane werden dabei extraluminal durch die Dolichol-Phosphat Mannosyltransferasen (DPMs) bzw. ALG5 von Nucleotidzuckern auf DOL-P übertragen und durch das MPDU1 in das ER geflippt. Das fertiggestellte 14-Zucker-Polysaccharid wird durch die Oligosaccharyltransferase (OST) von Dol-P-P auf Asparagin-Anteile des frisch translationierten Proteins übertragen, denen die Peptidsequenz – X – S/T folgt.

b) Die drei Typen der N-Glykane:

High-Mannose, komplexe und hybride N-Glykosylierung

Modifiziert nach *Essentials of Glycobiology: N-Glycans*, [253]

Rahmen eines Transfusionsunfalls zu lebensbedrohlichen Reaktionen des Immunsystems führen kann. Wie andere eukaryontische Zellen auch, tragen Erythrozyten neben den Blutgruppenantigenen eine Vielzahl weiterer Glykoproteine auf ihrer Zelloberfläche. Beachtenswert ist, dass im Rahmen einer Infektion mit *P. falciparum* die Anzahl dieser Proteine reduziert ist. Eine Datenbankanalyse des Genoms von *P. falciparum* zeigte, dass der Parasit weder über die Proteine des Stoffwechselweges für die *N*-Glykosylierung noch über die der *O*-glykolysierten Mucine verfügt [262]. Nichtsdestotrotz konnten mehrere *O*-Glykosylierungen bei *Plasmodien*-Proteinen nachgewiesen werden. So verfügt das auch als Zielstruktur der menschlichen Immunabwehr dienende MSP über gebundene Galaktose, GALNAC und GLCNAC.

1.2.5 *O*-GlcNAc – Ein Sonderfall

O-GlcNAcylierung oder *O*-*N*-acetylglucosaminierung beschreibt die Bindung eines einzelnen *N*-acetylglucosamins (GlcNAc) in β -Konfiguration an die Hydroxylgruppe eines Serins oder Threonins. Die Entdeckung des *O*-GlcNAcs ereignete sich zufällig. Bei der Nutzung boviner Milch-Galactosyltransferase zur Markierung endständigem GlcNAcs mit radiomarkierter Galaktose bei murinen Lymphozyten fiel der Gruppe um Gerald W. Hart auf, dass ein Großteil des markierten GlcNAcs sich, wider Erwarten, nicht terminal an komplexen *N*-glykosidisch gebundenen Glykokonjugaten befand, sondern als einzelne GlcNAc-Reste direkt an Serin und Threonin gebunden war. Weiterhin bemerkenswert war, dass dieses β -*O*-glykosidisch gebundene GlcNAc, im Gegensatz zu anderen Glykanen, nicht ausschließlich an der Zellmembranaußenseite vorkam, sondern im Zellinneren [Abbildung 4](#) [266]. In einer anschließenden Untersuchung wurde in Rattenleber-Zellen *O*-GlcNAc in der löslichen Fraktion und vor allem an Kernproteinen lokalisiert [131] und später detaillierter im Cytosol, der cytoplasmatischen sowie nukleoplasmatischen Seite von Kernporen [129] und dem Chromatin [147]. Zudem kommt *O*-GlcNAcylation bei mitochondrialen Proteinen vor [133].

1.2.6 Eine gut versteckte Modifikation

Wie kam es, dass eine der häufigsten Formen der Glykosylierung jahrelang unentdeckt blieb, obwohl die Modifikation inzwischen bei über 600 verschiedenen Proteinen und Organismen aller Gattungen nachgewiesen wurde? (vgl. dbOGAP Online Datenbank 2016). Eine Erklärung liegt in der geringen Größe der Modifikation. Die Bindung eines einzelnen Monosaccharids lässt sich nur, wenn es stark konzentriert an mehreren Stellen eines Proteins vorkommt, als Verschiebung in einem SDS-PAGE Gel erkennen. Des Weiteren wird die Modifikation schnell von freigewordenen lysosomalen Hexosamidasen oder anderen zelleigenen Proteasen abgespalten, wenn diese bei der Zellyse nicht inhibiert werden [275]. In der Massenspektrometrie (MS)

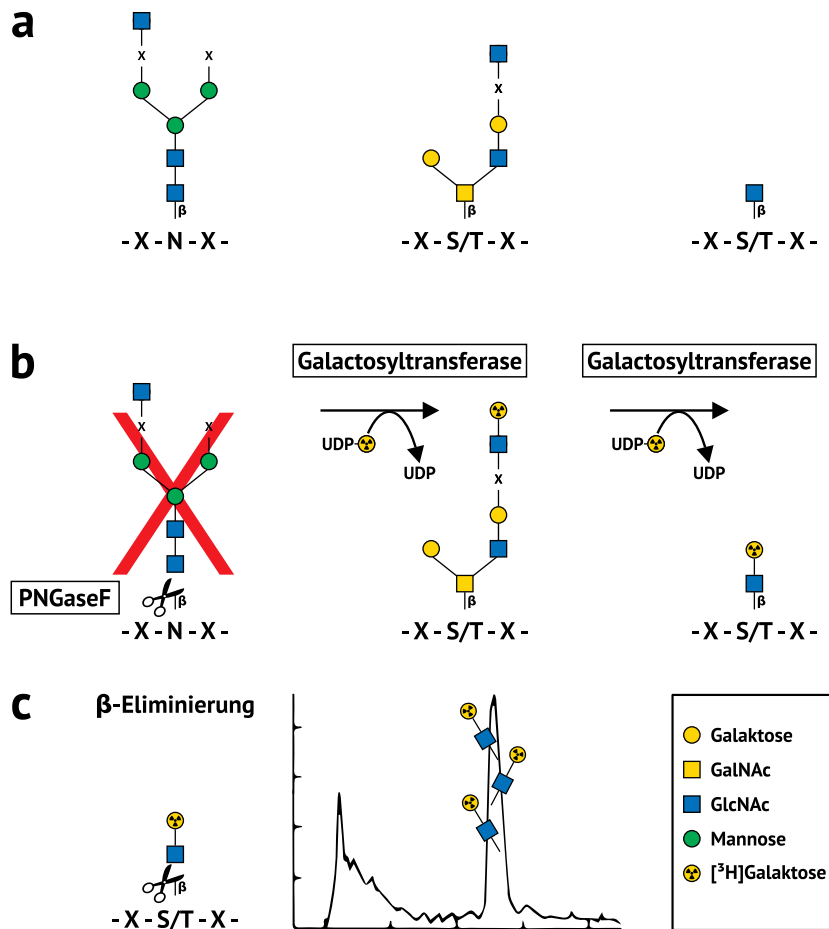


Abbildung 4: Schematische Darstellung des ersten Nachweises von O-Glcacylierung
 a) Es liegen verschiedene N- und O-glykosylierte Proteine mit endständigem GlcNAc vor.
 b) Abspalten der N-Glycosylierungen. Übertragung von radiomarkierter Galaktose auf enständiges GlcNAc der O-glykosylierten Proteine.
 c) In der Gel-Chromatografie fällt auf, dass durch β -Eliminierung große Mengen an markierten, einzelnen GlcNAc Resten frei gewordenen sind.
 Nach [266] Scheren-Icon by Pixel perfect, www.flaticon.com

geht die Modifikation aufgrund ihrer Labilität in der Gasphase bei der Ionisation der Peptide verloren. Erst durch β -Elimination und anschließende Michael-Addition lässt sich O-GlcNAc ausreichend stabilisieren, um es in der konventionellen CID-Tandem-Massenspektrometrie nachzuweisen [171]. Eine Alternative bildet die neuere *electron transfer dissociation* (ETD)-Massenspektrometrie, bei der die Modifikation erhalten bleibt [257]. Durch die Entwicklung spezifischer Antikörper und Kits zur Markierung lässt sich die O-GlcNAcylierung heute relativ einfach nachweisen.

1.2.7 Die hohe Dynamik des O-GlcNAcs

Bei der Untersuchung von O-GlcNAcyliertem α -Crystallin stellten Roquemore *et al.* fest, dass bei der Biosynthese, der Umsatz von O-GlcNAc viel höher war als der des Proteins [216]. Dies bekräftigte die Erkenntnis, dass O-GlcNAcylation eine Modifikation mit regulierenden Funktionen ist, die mit einer hohen Dynamik angehängt und abgespalten wird [146]. Immer mehr Parallelen zur Phosphorylierung taten sich auf. Beide Modifikationen reagieren auf den Ernährungszustand von Zellen, da Ihre Substrate eine wichtige Rolle im Energiehaushalt der Zelle spielen [120, 154]. Es zeigte sich, dass Phosphorylierung und O-GlcNAcylierung in einer Wechselbeziehung stehen und da sie beide an Serin und Threonin binden, sogar teilweise in Konkurrenz zueinander stehen. Dabei nehmen sie eine Art Schalterfunktion bei der Regulation verschiedener Proteinkonditionen ein [9]. Die beiden Modifikationen können jedoch auch zeitgleich an zwei oder mehreren Stellen des Proteins vorkommen [290].

1.2.8 Der Zyklus der Modifikation

Zwei Enzyme sind beteiligt daran, dass GlcNAc dynamisch an Proteine gebunden und von ihnen gelöst wird. Die O-GlcNAc Transferase (OGT) und die O-GlcNAcase (OGA) regulieren den Zyklus der O-GlcNAcylierung.

1.2.8.1 Die O-GlcNAc Transferase

Die OGT wurde 1990 identifiziert [114], zwei Jahre darauf gereinigt [113] und 1997 kloniert [170]. Die OGT, oder mit vollem Namen UDP-N-acetylglucosamine:peptide N-acetyl-glucosaminyltransferase, nutzt als Substrat Uridindiphosphat-gebundenes N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Dieses Substrat ist das Endprodukt des Hexosamin-Stoffwechselweges und die Vorstufe aller Aminozucker. UDP-GlcNAc ist Baustein der Biosynthese von Glykoproteinen, Glykolipiden, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen sowie von Chitin [117]. Der Hexosamin-Stoffwechselweg hat jedoch auch regulatorische Funktion, so beeinflusst er bei Säugern die Produktion und Aktivierung des Tumor-growthfactor β [229]. Die OGT hat eine sehr hohe Affi-

nität ($K_m = 545 \text{ nM}$) zu UDP-GlcNAc. Dies ermöglicht es ihr, trotz der im Vergleich zum ER oder dem Golgi-Apparat relativ geringen Konzentration von UDP-GlcNAc im Cytosol, ausreichend Substrat zu binden. Die UDP-GlcNAc Transporter in diesen Zellorganellen haben einen viel höheren K_M Wert [113]. Bei Säugetieren existieren drei durch alternatives Spleißen gebildete Varianten der OGT. Die nukleocytoplasmatische OGT mit 110 kDa nukleocytoplasmatische OGT (ncOGT) eine verkürzte Form mit 78 kDa; *short* OGT (sOGT) und eine mitochondriale Form mit 103 kDa; mitochondriale OGT (mOGT). Diese bilden miteinander Komplexe, die je nach Lokalisation aus verschiedenen Anteilen an sOGT und ncOGT zusammengestellt sein können [153]. Die mOGT wird im Zusammenhang mit Apoptose diskutiert, da eine Überexpression im Gegensatz zu den anderen OGTs toxisch wirkt [167]. Pflanzen verfügen über zwei unterschiedliche in Sequenzanalysen den OGTs entsprechenden Enzymen mit den kriminalistisch anmutenden Bezeichnungen SPINDLY (SPY) und SECRET AGENT (SEC) [123, 137]. Sie haben Einfluss auf unterschiedliche Entwicklungsabläufe der Pflanze. So zögert SPY das Blühen der Pflanzen heraus, während SEC die Anzahl der Blätter beeinflusst [122]. Inzwischen wurde SPY als O-Fucosyltransferase identifiziert und scheidet als mögliche OGT höchstwahrscheinlich aus [315]. Recombinant in der Zellkultur exprimiert, zeigten beide Enzyme im Vergleich mit humaner OGT keine O-GlcNAcylierungs-Aktivität [10]. Eine Anreicherung O-GlcNAcylierter Peptide gelang, jedoch mit fraglicher Spezifität [305]. Der direkte biochemische Nachweis der O-GlcNAcylierung bei Pflanzen war bis jetzt jedoch erfolglos [10].

Die OGT ist aus zwei Teilen aufgebaut, die über eine flexible Linker-Region miteinander verbunden sind [168]. Am N-Terminus des Enzyms liegen mehrere repetitive Tetratricopeptide (TPR). Dies sind 34 Aminosäuren lange Wiederholungen, welche die konservierte Sequenz WLGYAFAP tragen [158]. Die unterschiedlichen Isoformen tragen eine verschiedene Anzahl von TPR-Wiederholungen [118]. Auch zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden sich die TPR. Bei Nematoden sind sie beispielsweise besonders lang [154]. Diese Region ermöglicht die Protein-Protein-Interaktion des Enzyms. Hier binden die Empfängersubstrate, jedoch auch andere OGT Untereinheiten, bei der Bildung von Multimeren [136]. Nahe des C-Terminus des Enzyms befindet sich die katalytische Region [169]. Diese ist nochmals aufgeteilt in eine CDI Untereinheit, welche an das UDP bindet und eine „lectin-like“ CDII Untereinheit, die das Kohlehydrat bindet [215].

1.2.8.2 Die O-GlcNAcase

Der Gegenspieler der OGT ist die als O-GlcNAcase bezeichnete O-GlcNAc Hydrolase. Sie wurde erstmals 1994 von Dong und Hart isoliert und beschrieben [70]. Die OGA entfernt das O-GlcNAc über substratassistierte Katalyse. Der Mechanismus, wie sie das Substrat auf den hunderten verschiedenen O-GlcNAcylierten

Proteinen erkennt, ist noch ungeklärt [6]. Die OGA ist im Fokus intensiver Forschung. Aufrechterhaltung der O-GlcNAcylierung durch Inhibierung des Enzyms könnte als therapeutischer Ansatz mehrerer Erkrankungen dienen. Der Einsatz von OGA-Inhibitoren schützt bei Reperfusionstraumata nach Ischämien des Herzens [156] und wirkt entzündungsvermittelten vaskulären Dysfunktionen entgegen [128]. Vor allem wird die potentiell Alzheimer-präventive Wirkung des oral verfügbaren OGA-Inhibitors Thiamet-G untersucht. Hierbei wirkt die O-GlcNAcylierung einer, die Fehlfaltung des tau-Proteins begünstigenden, Phosphorylierung entgegen [282, 310]. Aktuelle Darstellung durch PET-Radioliganden zeigen bei Säugern eine Anreicherungen der OGA in Gehirn, Niere, Milz, Leber und Hoden [199]

1.2.9 Phylogenetik der O-GlcNAcylierung

Kurz nach Entdeckung der Modifikation in murinen Lymphozyten wurde O-GlcNAcylierung in kernlosen Zellen und in humanen Erythrozyten nachgewiesen [130]. Bei dem Nachweis O-GlcNAcylierter Proteine bei Viren fiel auf, dass diese auch hier nicht im Kapsid, sondern im Virusinneren liegen [102]. Es folgte der Nachweis bei Bakterien, wie Listerien [228] und Pneumokokken [236], bei Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) [116], Insekten (*Drosophila melanogaster*) [147] und schließlich den Apicomplexa *P. falciparum* und *Toxoplasma gondii* (T. GONDII) [65, 201]. Das Vorkommen O-GlcNAcylierter Proteine bei Hefen jedoch bleibt umstritten. Bei Algen und Pflanzen findet sich mit SEC ein Enzym, das als OGT dienen könnte [255]. Die Modifikation konnte jedoch bei *Arabidopsis Thaliana* nicht sicher nachgewiesen werden (vgl. [Unterabsatz 1.2.8.2](#)). Gleiches gilt für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* [10].

1.2.10 Die Beteiligung der O-GlcNAcylierung an zellulären Prozessen

Die PTM ist an verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt. Sie beeinflusst translationale und transkriptionelle Abläufe. So nimmt sie Einfluss auf den Kondensationsgrad von Chromatin durch Bindung an unterschiedliche, die Histone beeinflussende Chaperone und Proteine zur Histonmodifikation [163]. O-GlcNAcylierung kann die Inhibition der Proteinsynthese durch Phosphorylierung verhindern bzw. antagonisieren [314]. Sehr früh hat man die Modifikation an Kernproteinen nachgewiesen [115]. Daher wird die Funktion von O-GlcNAc als Signal für den Kerntransport diskutiert [106]. Eine wichtige Rolle nimmt die O-GlcNAcylierung auch in der Regulierung des proteasomalen Proteinabbaus sowie der Reaktion auf zellulären Stress und Nährstoffveränderungen ein [312],[311],[316].

1.2.11 O-GlcNAcylierung und Pathogenese

Neben der Erforschung des O-GlcNAcoms verschiedener Spezies liegt der Fokus aktueller Untersuchungen der Modifikation vor allem auf deren Einfluss auf verschiedene pathologische Prozesse, insbesondere beim Menschen. Aufgrund der Beteiligung der O-GlcNAc-Modifikation an so unterschiedlichen zellulären Funktionen ist diese auch in eine Vielzahl pathologischer Prozesse involviert.

Bezüglich neurodegenerativer Erkrankungen scheint eher ein protektiver Einfluss zu bestehen. Verstärkte O-GlcNAcylierung von Amyloid verhindert die Bildung sogenannter „seniler Plaques“. Bei *tau*-Proteinen verhindert ebenfalls die Antagonisierung von Phosphorylierung die Aggregation. Beide Prozesse sind vermutlich Hauptfaktoren der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung. Ebenso führt O-GlcNAcylierung zu reduzierter α -Synuclein-Akkumulation, deren Ablagerung Hauptmerkmal der Synucleopathien wie Morbus Parkinson ist [285].

Die ausgeprägte Empfindlichkeit bezüglich Nährstoffangebot und -überangebot kann wohl den negativen Anteil der PTM an der Entstehung metabolischer Erkrankungen erklären. Es konnte gezeigt werden, dass die Modifikation den Insulin-Signalweg, die Insulin vermittelte Aufnahme von Glukose in die Leberzellen sowie die Glykogen-Synthese blockiert. All dies sind typischerweise mit der Insulinresistenz bei *Typ-2*-Diabetes mellitus verknüpfte Dysregulationen. Zudem wird ihr eine Rolle bezüglich der Glukose-Toxizität zugesprochen, die viele Folgeschäden der Erkrankung bedingt [135].

Die Abhängigkeit von Krebszellen von einer Erhöhung des Glukose-Metabolismus ist als „Warburg Effekt“ bekannt. In der engen Verbindung zwischen zellulärer Zucker-Aufnahme und O-GlcNAcylation liegt daher vermutlich auch deren verstärkender Effekt auf neoplastische Erkrankungen begründet. Sie wirkt aktivitätssteigernd auf verschiedene Protoonkogene wie *MYC* und Transkriptionsfaktoren wie NF κ B. Eine stimulierende Wirkung ist bisher für die Proliferation, Migration und Widerstandsfähigkeit maligner Zellen beschrieben [141].

1.2.12 Nachweis der O-GlcNAcylierung bei *P. falciparum*

Nachdem in den ersten Jahren nach Entdeckung der O-GlcNAcylierung diese bei vielen verschiedenen Spezies nachgewiesen wurde, waren es Angela Dieckmann-Schuppert *et al.*, die 1993 die Modifikation zum ersten Mal bei *P. falciparum* nachwiesen. Sie nutzen die gleiche Herangehensweise wie schon Hart *et al.* bei der Entdeckung des O-GlcNAc, indem sie die Modifikation über eine Galactosyltransferase mit radiomarkierter Galaktose markierten und die abgespaltenen Glykane in der Gelelektrophorese analysierten (vgl. [Abbildung 4](#)). In gleicher Weise konnten sie zeigen, dass lysierte *P. falciparum* Enzyme O-GlcNAc auf den synthetischen Akzeptor Pro-Tyr-Thr-Val-Val transferieren können und schlossen daraus, dass der

Parasit über eine O-GlcNAc-Transferase verfügen muss. Zudem zeigte sich, dass die auf diese Weise übertragenen Hexosamine β -gebunden sind und unter *in vitro*-Bedingungen nicht zu größeren Glykanen verlängert werden [65]. Zudem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass das Proteom des Parasiten wohl ausschließlich durch O-Glykane modifiziert ist und N-Glykosylierung hier nicht vorkommt. [66]. Das Fehlen beziehungsweise Vorhandensein der N-Glykosylierung bei *P. falciparum* bleibt bis heute umstritten. Neuere Untersuchungen weisen eher daraufhin, dass diese, soweit vorhanden, vielmehr bei sehr frühen Stadien des Parasiten vorkommen [150] und nur wenige Moleküle lang sind [48], beziehungsweise schon in ihren Vorstufen unterdrückt werden [39]. 2011 nutzen Perez Cervera *et al.* inzwischen verfügbare Antikörper gegen O-GlcNAc, um den Nachweis der Modifikation zu bestätigen. Bei dem ebenfalls der Gruppe der Apicomplexa angehörigen, protozoären Parasiten *T. gondii* gelang in dieser Arbeit über Sequenz-Alignment die Identifikation einer putativen OGT. Bei *P. falciparum* konnten keine mit der OGT anderer Spezies übereinstimmenden Sequenzen identifiziert werden [201]. Eine Identifizierung der O-GlcNAcylierten Proteine war jedoch bei *P. falciparum* bis dato noch nicht erfolgt.

Teil II

HAUPTTEIL

ZIELSETZUNG

Die posttranslationale Modifikation von *P. falciparum*-Proteinen durch das Anhängen von *O*-GlcNAc wurde schon in den neunziger Jahren auf Grundlage radiobiochemischer Untersuchungen belegt [65]. Der direkte Nachweis der Modifikation individueller Proteine durch spezifische *O*-GlcNAc-Antikörper bei *P.falciparum* und *T.gondii* gelang das erste Mal 2011 [201].

Ziel dieser Dissertation sollte sein, den Nachweis der Existenz *O*-GlcNAcylierter Proteine bei *P. falciparum*, durch die Anwendung weiterer biochemischer Techniken zu untermauern. Mit Hilfe spezifischer Antikörper, Lektine und *click chemistry* sollten zudem das *O*-GlcNAcom des Parasiten angereichert und seine Bestandteile massenspektroskopisch identifiziert werden. Die Ergebnisse der Identifizierung sollten mit denen aus parallel an *T. gondii* durchgeführten Untersuchungen verglichen werden. Hierdurch sollte ein allgemeiner Einblick gewonnen werden, an welchen Stoffwechselwegen der Apicomplexae *O*-GlcNAcylierte Proteine beteiligt sind. Durch bioinformatische Methoden wie *sequence alignment* und der statistischen Vorhersage von *O*-GlcNAcylierungsstellen sowie einer Literaturrecherche bezüglich *O*-GlcNAc-modifizierbarer Isoformen der identifizierten Proteine bei anderen Organismen – insbesondere *T.gondii* – sollten Hintergrundinformationen zur Funktion der PTM und ihrer Eignung als mögliches Therapieziel erlangt werden.

Im zweiten Teil der Dissertation sollten die Hintergründe der Modifikation bei *P. falciparum* näher beleuchtet werden. So sollte untersucht werden, woher der Parasit UDP-GlcNAc das für die *O*-GlcNAcylierung benötigte Substrat bezieht. Zudem sollte der Einfluss der Inkubation mit dem beim Menschen wirksamen OGA-Inhibitor Thiamet-G auf die Entwicklung von Parasitenkulturen untersucht werden.

MATERIAL

3.1 GERÄTE

Produkt	Typ	Hersteller
Analysewaage		Sartorius
Eppendorf-Zentrifuge	Biometra	Heraeus
Brutschrank		Thermo Scientific
Chemoluminometer	Fusion	Vilber Lourmat
Chemoluminiszenz-Software	Capt Advance	Vilber Lourmat
Densitometer	GS-800	Bio-Rad
Digitales Mikroskop	EVOS XL core	AMG
Elektrophoresesystem		Bio-Rad
Gradient maker	GM 383	Bio-Rad
Heizblock		BioRad
Inkubator	Modular Incub. Chamber	Billups-Rothenberg
Magnetrührer		IKA
Mikroskop	Laborlux	S Leitz
Mikrowelle	Sharp Nanodrop 3300	Thermo Scientific
pH-Meter		Seven
Pumpe	miniplus 3	Gilson
Rüttler	Genie2	Vortex
Sicherheitswerkbank		Heraeus
Ultraschallbad	FS30	Thermo Fisher
Ultraschallsonde	Cell Disruptor B-30	Branson Sonic Power
Zellkulturschrank	37 °C/ CO ₂	Heraeus

3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Produkt	Typ	Hersteller
Deckgläser	12 mm	Menzel
Kanülen	21 – 27 G	Braun
Kryoröhrchen	1,0 ml	Satstedt
Nitrozellulosemembran	Whatman-Papier	GE Healthcare
Optical Reaction Plate	96-well	Greiner Bio-One
Objektträger	76 x 22 mm	Menzel
Parafilm	M	Bemis
Petrischalen	9 cm	Sarstedt
Pipetten	Glas	Hirschmann TechColor
Pipetten	Easy Mettler Toledo	Gilson/Eppendorf
Pipettenspitzen	tip-one 10, 200, 1000 µl	Starlab
Pipettenspitzen	Zip-Tip® C ₁₈	Merck
Reaktionsgefäße	„Falcon“ 15 – 50 ml	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße	2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße	0,5 ml	Eppendorf
Scanner	FLA-5100	Fuji
Sterilfilter	0,025 µm/0,45 µm	millipore
Spritzen	1 ml, 5 ml, 60 ml	BD
Zellkulturflaschen	25 – 175 cm ³	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten	6 und 12-well	Greiner Bio-One

3.3 CHEMIKALIEN

Produkt	Hersteller
Aceton	VWR
Acetonitril (ACN)	Prolabo, VWR
Acrylamid/Bis (29:1)	Sigma-Aldrich

Fortgesetzt auf der nächsten Seite

Fortsetzung Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acrylamidlösung 40 %	Bio-Rad
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Riedel-de-Haën
Bis-Lösung 2 %	Bio-Rad
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Brilliant Blue R	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Prolabo
Chloroform	Sigma-Aldrich
Desoxycholsäure	amresco
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Carlo Erba
Ethanol absolut (EtOH)	VWR
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Panerac
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Formaldehyd 37 %	Sigma-Aldrich
GLC	Panreac
Glycerol	Euromedex
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Euromedex
Hypoxantin	Sigma-Aldrich
Iodacetamid	Bio-Rad
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Prolabo
Mangan(II)-chlorid (MnCl ₂)	Prolabo
Methanol	VWR
Methanol (MeOH)	VWR
Milchpulver	Regilait
N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin (TEMED)	amresco
Natriumacetat (HPLC-Grade)	Sigma-Aldrich

Fortgesetzt auf der nächsten Seite

Fortsetzung Chemikalien

Produkt	Hersteller
Natriumcarbonat	Riedel-de-Haën
Natriumchlorid (NaCl)	VWR
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Genomic Solution
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich
Neomycinsulphat	Sigma-Aldrich
NP-40 Alternative	Millipore
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor Cocktail (Tabletten)	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	Gibco BRL
Salzsäure (HCl)	Carlo Erba
Silbernitrat (AgNO ₃)	Riedel-de-Haën
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich
Tween®-20	Serva
β-Mercaptoethanol	Fluka

3.4 NUKLEOTIDZUCKER

Produkt	Hersteller
ADP-Glc	Sigma-Aldrich
GlcNAc	Sigma-Aldrich
UDP	Sigma-Aldrich
UDP-GALNAc	Sigma-Aldrich
UDP-GlcNAc	Sigma-Aldrich
UMP	Sigma-Aldrich

3.5 KITS

Produkt	Hersteller
Super Signal® West Femto Maximo	Thermo Scietontific
Pierce® ECL 2 Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Super Signal® West Pico (Trial)	Thermo Scientific
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
PNG _{ASE} F	New England BioLabs
Click-iT™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System	invitrogen
Click-iT™ Biotine Protein Analysis Detection Kit	invitrogen

3.6 ANTIKÖRPER

Protein	Spezies	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
RL 2	Maus	mono	Thermo	1:4000
α -tubulin	Maus	mono	Santa Cruz	1:2000
β -tubulin	Kaninchen	poly	Thermo	1:2000
HSP 70	Maus	mono	StressGen	1:2000
Mouse	Schaf	mono	GE	1:10.000
Rabbit	Esel	mono	GE	1:10.000
Andere Reagenzien:				
Horseradish Peroxidase Avidin D			Vector	1:15.000
sWGA Agarose-Perlen			Vector	

3.7 LÖSUNGEN, PUFFER, NÄHRMEDIEN

3.7.1 Färbelösungen

COOMASSIE-BLAU-FÄRBUNG		
Färbelösung	20X Coomassie Brilliant Blau	5 %
	Ethanol	45,5 %
	Essigsäure	9,2 %
	H ₂ O	40,3 %
Entfärbelösung	Ethanol:	30 %
	Essigsäure:	10 %
	H ₂ O:	60 %
COOMASSIE-COLOIDAL-FÄRBUNG		
Färbelösung	20X R250	5 %
	ATCA	12 %
	H ₂ O	83 %
Entfärbelösung	H ₂ O	100 %
SILBERNITRAT-FÄRBUNG		
Silberlösung	AgNO ₃	0,1 g
	Formaldehyd 37 %	28 µl
	H ₂ O	100 ml
Entwicklerlösung	Natriumcarbonat	2,4 g
	Formaldehyd 37 %	28 µl
	Natriumthiosulfat 10 %	12,5 µl
	H ₂ O	100 ml
Stopplösung	TRIS base	4 g
	Formaldehyd 37 %	28 µl
	Essigsäure	2 ml
	H ₂ O	100 ml

3.7.2 Pufferlösungen

LYSEPUFFER		
RIPA Puffer pH 7,4	NaCl	150 mM
	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	Triton X-100	1 % (v/v)
	Desoxycholsäure	0,5 % (w/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
Homogenisierungs Puffer (sWGA) pH 7,5	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Triton X-100	0,5 % (v/v)
Hypotonischer Puffer (für HPLC) pH 7,2	MgCl ₂	1 mM
	Tris-HCl	10 mM
	NaCl	10 mM
	β-Mercaptoethanol	10 mM
ANREICHERUNGSPUFFER		
für s-WGA Perlen pH 7,5	Tris-HCl	10 mM
	NaCl	100 mM
	Desoxycholsäure	0,4 % (v/v)
	SDS	0,3 % (w/v)
	Nonidet P-40	0,2 % (v/v)
für Streptavidin Perlen	PBS	
	Triton X-100	1 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
Phosphat-Puffer (für PNGase F) pH 7,5	Phosphorsäure	2,91 ml
	NaCl	titriert

Fortgesetzt auf der nächsten Seite

Fortsetzung Puffer

PROBENPUFFER		
2X Laemmli	SDS 20 %	20 %
	Glycerol	10 %
	2-mercaptoethanol	5 %
	Tris 0,5M pH6,8	12 %
5X Laemmli	SDS	10 % (w/v)
	Glycerol	25 %
	2-mercaptoethanol	12,5 %
	Tris 0,5M pH6,8	30 %
SDS-PAGE PUFFER		
10 % APS	APS	10 % (w/v) in H ₂ O
20 % SDS	SDS	20 % (w/v) in H ₂ O
Sammelgelpuffer, pH 6,8	Tris-HCl	0,5 M
Trenngelpuffer, pH 8,8	Tris-HCl	1,5 M
SDS-Laufpuffer	TG 10x	10 % (v/v) in H ₂ O
WESTERN-BLOT PUFFER		
TBS		
TBS-TWEEN-20	Tween-20	0,1 % in TBS
Blockierungspuffer I	Milchpulver	5 % in TBS-Tween
Blockierungspuffer II	BSA	4 % in TBS-Tween
HPLC PUFFER		
Puffer A 1	NaOH	10 mM
Puffer B 1	NaOH	10 mM
	Natriumacetat	1 M
Puffer A 2 pH 9,2	Tris	20 mM
Puffer B 2	NaCl	2 M

3.7.3 *P. falciparum* In-vitro-Kultur

Kulturmedium		
Natriumhydrogencarbonat-NaHCO ₃ Lösung		5 % in H ₂ O
Neomycin-Lösung	Neomycinsulfat	1 % in H ₂ O
Kulturmedium inkomplett	RPMI-1640-Pulver	5,195 g
	HEPES	5,95 g
	Hypoxanthin (Base) in H ₂ O	50 mg 900 ml
	Kompletierung	+ FFP - fibrinfrei
	+ NaHCO ₃ -Lösung	40 ml
	+ Neomycin-Lösung	10 ml
Erythrozyten-Lysepuffer		
SSC-Puffer	NaCl	8,766 g
	Na ₃ -Citrat	4,412 g
	in H ₂ O	1000 ml
Saponin-Lösung	Saponin	1 ml
	in H ₂ O	99 ml
Lysepuffer	SSC-Puffer	985 ml
	Saponin-Lösung	15 ml

3.8 PARASITEN

P. falciparum Stamm 3D7 geht aus dem Stamm NF54 hervor, der in den Niederlanden bei einem Patienten mit Flughafen-Malaria isoliert werden konnte. Das Genom des Stammes wurde im Rahmen des „Malaria Genome Project“ sequenziert und ist online über die Bibliothek „PlasmoDB“ <http://www.plasmodb.org/plasmo/> zugänglich.

METHODEN

4.1 KULTIVIERUNG VON *P. FALCIPARUM*

4.1.1 Kulturbedingungen

Die *P. falciparum* Kulturen wurden modifiziert nach Trager & Jensen[268] in gasdichten Kulturflaschen, kleinere Mengen in Petrischalen in gasdichten Inkubatoren mit einem 5 % O₂, 5 % CO₂ und 90 % N₂ Gasmisch begast und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Medium diente ein modifiziertes RPMI Medium, welchem 2,5 % *Fresh Frozen Plasma* (FFP) beigefügt wurde. Der Hämatokrit in der Kultur betrug 5 %. Das Medium wurde in der Regel täglich gewechselt. Das alte Medium wurde hierfür direkt vorsichtig abgesaugt oder zuvor 5 Minuten bei 500 g und 4 °C abzentrifugiert.

4.1.2 Kontrollausstriche

Kontrollausstriche wurden eine Minute mit Methanol fixiert, 10 Minuten mit Giemsa-Lösung gefärbt (1:4 mit Wasser gemischt), mit bidestiliertem Wasser abgewaschen und luftgetrocknet. Der Ausstrich wurde daraufhin unter einem Öl-Immersionmikroskop bei 100-facher Vergrößerung betrachtet.

4.1.3 Vermehrung der Parasitenkultur

Eine zu hohe 12–15 %, bzw. zu niedrige >0,2 % Parasitämie kann zum Absterben der Kultur führen. Daher wurde stets darauf geachtet, eine ideale Parasitämie zu erhalten. Wurde im Kontrollausstrich bei der Auszählung der Parasiten mithilfe eines Zählkulars eine Parasitämie zwischen 7 % und 10 % festgestellt, wurden die Kulturen splittiert. Hierfür wurden sie 5 Minuten bei 500 g und 4 °C zentrifugiert, das Medium im Überstand verworfen, die IRBC auf 2–3 neue Gefäße aufgeteilt und weiteres Erythrozytenkonzentrat (EK) hinzugegeben, sodass nach Hinzufügen des Mediums der Hämatokrit wieder bei 5 % lag.

4.1.4 Parasitenaufreinigung

Wirkungsmechanismus: Da bei *P. falciparum* die Vermehrung der Parasiten nicht synchron abläuft, liegen nach einigen Zyklen Ring- und adulte Trophozoitenstadien,

bzw. Schizonten stark gemischt vor [268]. Um isolierte Proben der einzelnen Stadien gewinnen zu können, müssen diese getrennt werden. Hierfür wurde die Eigenschaft von *Plasmodium* genutzt, diamagnetisches Fe(II)-haltiges Hämoglobin in paramagnetisches Fe(III)-haltiges Hämozin umzuwandeln. Gibt man iRBCs in eine in einem Magnetfeld gelagerte *Magnetic Cell Separation* (MACS) Säule, werden die in hämozinreichen Erythrozyten liegenden Schizonten und adulten Trophozoiten in der Säule zurückgehalten, während die in hämoglobinreichen Erythrozyten gelegenen Trophozoiten im Ring Stadium mit den uRBC durch die Säule fließen [212]. *Durchführung:* Hierfür wurden pro Aufreinigungsdurchgang die in RPMI-Medium suspendierten Erythrozyten aus 20 Petrischalen oder 5 Kulturflaschen über 5 Minuten, bei 500 g und Raumtemperatur abzentrifugiert, das Medium verworfen und die verbliebenen 10–12,5 ml Erythrozyten in 20 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gepoolt. An die MACS Säule wurde über einen Drei-Wege-Hahn eine Kanüle angeschlossen, um den Durchfluss auf 1–3 Tropfen pro Sekunde zu verlangsamen und so zu verhindern, dass hämozinreiche iRBCs von dem Fluss mitgerissen werden. Die Säule wurde mit warmem PBS-0,5 % BSA äquilibriert. Die in PBS suspendierten Erythrozyten wurden auf die Säule gegeben bevor diese trocken lief. Sobald sich die Tropfen an der Kanüle rötlich verfärbten, wurde das Eluat in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Von oben wurde PBS nachgefüllt, sobald die Erythrozyten in die Säule eingesickert waren. War das Eluat nach wiederholtem Zugeben von PBS wieder klar geworden, wurde der Hahn geschlossen und die Säule aus dem Magnetfeld genommen. Über eine 60 ml Spritze konnten nun die in der Säule verbliebenen iRBCs mit PBS eluiert werden.

4.1.5 Lyse der Parasiten

Um die Parasiten von ihren Wirtszellen zu befreien, wurden die Erythrozyten mit einem Saponin Puffer lysiert (modifiziert nach Goman [99]). Hierbei wird ausgenutzt, dass Saponin sowohl die Erythrozyten-Membran als auch die Membran der parasitophoren Vakuole perforiert, die Parasitenmembran jedoch intakt lässt. [38] Die iRBCs wurden zwei Mal mit gekühltem PBS gereinigt und jeweils 5 Minuten mit 500 g bei 4 °C abzentrifugiert. 4–5 ml Erythrozyten-Konzentrat wurden mit Saponin-Lysepuffer auf 50 ml aufgefüllt und sofort stark geschüttelt und 20 Minuten auf Eis gelassen, wobei nach 10 Minuten erneut geschüttelt wurde, um eine Lyse aller Erythrozyten zu gewährleisten. Anschließend wurde 15 Minuten mit 1400 g bei 4 °C zentrifugiert. Die Parasiten setzten sich als Pellet ab, während die Membranreste der lysierten Zellen im Überstand verblieben. Das Pellet wurden mit eiskaltem PBS gewaschen (erneut bei 1400 G) bis der Überstand klar war. Das abzentrifugierte Pellet wurden in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren. Alle Schritte der Lyse erfolgten im Eis.

4.1.6 *Anfertigen und Auftauen von Kryopreservaten*

Zum Anlegen eines Kryopreservats eignet sich eine Kultur mit genügend hoher Parasitämie 8–10 % und einem hohen Anteil an Parasiten im frühen Ringstadium, da nur diese den Tiefgefrierprozess überstehen. Eine 30%ige Dimethylsulfoxid (DMSO) Lösung in RPMI-Medium (komplett) wurde hergestellt. Dies geschah auf Eis, da sich die Lösung beim Mischen sehr stark erhitzt. Zu den gereinigten iRBCs wurde ungefähr die gleiche Menge an FFP gegeben. Nun wurde sehr langsam, tröpfchenweise die vierfache Menge der zuvor zubereiteten 30%igen DMSO-Lösung unter Schwenken des Röhrchens hinzugegeben. In Kryoröhrchen zu 1 ml aliquotiert wird das Konservat direkt in einem Tank mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Auftauen eines Kryopreservats wurde dieses im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt, direkt in ein 15 ml Röhrchen überführt und sofort, sehr langsam und unter ständigem Schwenken, tröpfchenweise auf 37 °C vorgewärmtes RPMI-Medium (komplett) gegeben. Anschließend wurde drei Mal 5 Minuten mit 500 g bei 4 °C mit Medium gewaschen, um das verbleibende DMSO zu entfernen. Schließlich werden die iRBCs in eine Petrischale gegeben und 700 µl 50%iges uRBC-Konzentrat, sowie 10 ml RPMI-Medium (komplett) hinzugegeben. Nun kann die Kultur unter oben genannten Bedingungen gestartet werden.

4.1.7 *Waschen der Erythrozyten*

Die für die Kultur verwendeten sterilen, leukozytenarmen EKs (Blutbank, Universitäts-Klinikum Marburg) hatten stets die Blutgruppe A-positiv. Die EKs wurden steril mit Hilfe eines Transfusionsbestecks zu je 25 ml in 50 ml Röhrchen aliquotiert. Sie wurden drei Mal mit 25 ml PBS def gewaschen und dieses jeweils für 5 Minuten mit 500 g bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde auf das Erythrozyten-Pelett ungefähr die gleiche Menge RPMI-Medium (komplett) gegeben. Das 50%ige Erythrozyten-Konzentrat konnte für einen Monat bei 4 °C gelagert werden.

4.1.8 *Reinigung des FFPs*

Das für die Kultur verwendete, sterile FFP aus der Blutbank des Universitäts-Klinikums Marburg wurde über Nacht bei 4 °C aufgetaut. Es wurde steril, mithilfe eines Transfusionsbestecks in 50 ml Röhrchen aliquotiert. Um das Fibrin im FFP auszufällen, wurden zu 40 ml FFP je 1,6 ml 10%iger Ca^{2+} Lösung hinzugegeben und gut gemischt. Nun wird das FFP 30 Minuten bei 37° inkubiert und über Nacht bei 4 °C belassen. Das kolligierte Fibrin kann nun abzentrifugiert und das fibrinfreie Plasma in einem frischen Röhrchen bei -80 °C gelagert werden.

4.2 PROTEINNACHWEIS

4.2.1 *Proteinextraktion*

Zur Extraktion O-GlcNAcylierter Proteine wurden die tiefgefrorenen Parasitenproben zehn Minuten auf Eis in Lysepuffer inkubiert. Verlängerte man diese Zeit auf 60 Minuten, ließen sich größere Mengen Proteine extrahieren. Um die Parasitenpellets gut zu lösen, wurde das Eppendorfröhrchen in ein Ultraschallbad gehalten. Das Bad wurde nicht geschlossen, um manuell Ultraschallknoten mit der höchsten Intensität aufzusuchen und somit die Beschallungsdauer so kurz wie möglich zu halten. Die Probe wurde 10 Minuten bei 28.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Die extrahierten Proteine fanden sich im Überstand. Dieser wurde direkt weiterverwendet oder bei -80 °C aufbewahrt (max. 2 Wochen).

4.2.2 *Bestimmung der Proteinkonzentration*

Um die Konzentration der extrahierten Proteine zu bestimmen, wurden 10 µl des Proteinextrakts abgenommen und mit 40 µl Lysepuffer verdünnt (1:5). Hiervon wurden je 10 µl in drei Vertiefungen einer 96-well-Platte gegeben. Die verbliebenen 20 µl wurden mit 20 µl Lysepuffer verdünnt (1:10) und hiervon abermals je 10 µl in drei Vertiefungen gegeben. Eine Verdünnungsreihe mit 10, 20, 50, 100, 200 und 600 mg/ml Albumin in Lysepuffer wurde zubereitet und als Standard ebenfalls je 10 µl in drei Vertiefungen gegeben. In jede Vertiefung wurden nun 100 µl zuvor nach Herstellerangabe zubereitete Pierce BCA Reagenz gegeben. Nach 30 Minuten Inkubationszeit konnte die optische Extinktion ausgewertet werden.

4.2.3 *SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese*

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer diskontinuierlichen Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)) modifiziert nach Lämmli [157]. Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

Trenngel (10 %)		Sammelgel	
Tris/HCl pH 8,8	37,5 %	Tris/HCl pH 6,8	15 %
SDS 20 %	0,5 %	SDS 20 %	0,5 %
Acrylamid/Bis (29:1)	25 %	Acrylamid/Bis (29:1)	10 %
TEMED	0,15 %	TEMED	0,3 %
+ 0,47 % APS		+ 0,32 % APS	
Für Trenngel mit abweichender Konzentration:			
8 %		Acrylamid/Bis (29:1)	20 %
12,5 %		Acrylamid/Bis (29:1)	31,25 %
15 %		Acrylamid/Bis (29:1)	37,5 %

Für Gele mit Konzentrationsgradient wurden Trenngelzubereitungen mit 8 % und 12,5 % in die Kammern eines Gradient Makers (Biorad) gegeben (die höher konzentrierte in die hintere Kammer) und über eine Schlauchquetschpumpe zwischen die Platten gepumpt.

4.2.4 Färbung der Gele

Zur Sichtbarmachung der in der Gelelektrophorese getrennten Proteine wurden mit einer Coomassie-Blau Färbung gefärbt, in Entfärbelösung aus 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure inkubiert und mit H₂O gereinigt.

Gele, die anschließend in der Massenspektroskopie analysiert werden sollten, wurden mit einer Coomassie Coloidal Färbung angefärbt und anschließend mit hochreinem Wasser entfärbt. Zur Sichtbarmachung des O-GlcNAcylierten Proteoms nach Inkubation mit Succinyliertes Weizenkeim-Lektin (sWGA)-Perlen nutzen wir eine Silbernitrat-Färbung. Hierzu wurden die Proteine über Nacht in einer Lösung aus 30 % Ethanol und 5 % Essigsäure fixiert und die Gele danach 3x mit hochreinem Wasser ausgewaschen. Anschließend wurden sie über eine Minute in einer 0,02%igen Natriumthiosulfat-Lösung inkubiert und danach 2x mit hochreinem Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgte über 1,5 h abgedeckt in einer Silbernitratlösung. Nach einmaligem schnellem Waschen wurde bis zum Sichtbarwerden der Banden mit Natriumcarbonat-haltiger Lösung entwickelt. Der Entwicklungsprozess wurde in einer TRIS-Pufferlösung gestoppt.

4.2.5 Western Blot

Die Proteine wurden im Wester Blot (nach Towbin *et al.* [267]) auf Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet). Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintrans-

fers wurde die Membran mit einer Ponceau-Rot-Färbung angefärbt. Anschließend wurde die Membran, je nach gewünschtem Antikörper, für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer I (5 % Milchpulver in TBS-Tween), oder in Blockierungspuffer II (4 % BSA in TBS-Tween) gesättigt. Sie wurde drei Mal für 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen und über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer I oder II mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut in TBS-Tween gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper in Blockierungspuffer I oder II inkubiert. Nach weiterem Waschen in TBS-Tween konnte die Membran in Dunkelheit für 5 Minuten mit einer Chemolumineszenz-Lösung inkubiert und die Proteine unter einer Kamera sichtbar gemacht werden. Für eine Inkubation mit Avidin zum Sichtbarmachen biontinierter bzw. Biotin-markierter Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer II gesättigt, in TBS-Tween gewaschen, 45 min mit Avidin-HRP in Blockierungspuffer II inkubiert und die Proteine über Chemilumineszenz wie oben beschrieben sichtbar gemacht.

4.2.6 Der RL2-Antikörper

Der IgG₁ Antikörper RL2 wurde erstmals 1987 von Claudette Snow, A. Senior *et al.* hergestellt, um die Zellkernhülle in Rattenleberzellen zu untersuchen. Sie beobachteten, dass der Antikörper acht verschiedene Proteine der Kernporenkomplexe, den Verbindungskanälen zwischen dem zytoplasmatischen und dem nukleären Raumes, erkennen konnte [249]. Kurz darauf konnten Gordon Holt und Gerald Hart *et al.* in Zusammenarbeit mit Frau Snow nachweisen, dass diese Proteine allesamt O-GlcNAcyliert sind und der Antikörper an O-GlcNAc bindet. RL2 kann somit als Antikörper zur Darstellung der O-GlcNAcylierung genutzt werden. Allerdings benötigt der Antikörper gewisse sekundäre und tertiäre Proteinstrukturen, um zu binden. Er kann daher nicht zur Immunopräzipitation O-GlcNAc-modifizierter Proteine genutzt werden [129]. Zudem zeigt RL2 eine relativ schlechte Bindung an O-GlcNAcylierte Proteine unter 50 KDa [210]

Trotz der oben genannten Einschränkungen gewährt der monoklonale Maus-Antikörper eine zu vergleichbaren Antikörpern wie CTD_{110.6} höhere Spezifität und eignet sich somit für eine schnelle und unkomplizierte Darstellung des O-GlcNAcoms in der Chemilumineszenz. [59]. Er wurde daher für die Überprüfung der Proben, der verschiedenen Extraktionstechniken sowie zur orientierenden Darstellung des O-GlcNAcoms verwendet.

4.2.7 Biotin-Markierung O-GlcNAcylierter Proteine mit ClickIt™ Enzymatic Labeling System

Wirkungsmechanismus: O-GlcNAcylierte Proteine werden mit Hilfe der β -1,4-galactosyltransferasen Mutante Gal-T1 (Y289L) markiert. Diese ermöglicht die β -1 \rightarrow 4-glycosidische Bindung von azido-modifizierter Galaktose (GalNAz), von UDP-GalNAz auf O-GlcNAc. Dergestalt markierte Proteine können daraufhin, über Cu^{2+} -katalysiert, an acyliertes Biotin binden.

Durchführung: RIPA extrahierte Enzymlösung wurden zunächst mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGASE F) (bzw. die Negativkontrolle mit Glycerin) behandelt, um eventuell vorhandenes N-glycosidisch gebundenen GlcNAcs abzuspalten (vgl. [Unterabschnitt 4.3.3](#)). Anschließend wurden die *P.falciparum*-Proteinlösungen und die als Kontrolle der PNGase dienende Conalbumin-Lösungen mit 1 % SDS, 20 mM HEPES pH 7.9 verdünnt, um 200 μl Lösung mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ zu erhalten. Die gelösten Proteine wurden präzipitiert. Hierfür wurden nacheinander 600 μl Methanol, 150 μl Chloroform und 400 μl hochreines Wasser zu der Proteinlösung gegeben. Das Methanol und das Chloroform waren zuvor auf -80°C gekühlt, das Wasser auf 4°C . Nach dem Hinzugeben der jeweiligen Reagenzien wurde kurz aufgewirbelt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 18.000 g und 4°C bildeten sich zwei Phasen mit den präzipitierten Proteinen in der Interphase. Die obere Phase wurde verworfen und 450 μl Methanol hinzugegeben. Nach erneutem Aufwirbeln und Zentrifugation bei gleichen Konditionen wie zuvor, setzen sich die Proteine am Gefäßboden ab. Der Überstand wird verworfen und das Gefäß für 5 Minuten geöffnet auf ein Tuch gestellt, sodass die verbleibende Flüssigkeit verdunsten kann. Die Proteine werden in 40 μl 1 % SDS 20 mM HEPES pH 7,9 resuspendiert. Um eine gute Lösung der Proteine zu gewährleisten, wurde nun 10 Minuten bei 90°C im Heizblock erhitzt und bei Bedarf zwischendurch aufgewirbelt. Die Lösung wurde abgekühlt, um die zuzugebenden Enzyme nicht zu denaturierten, jedoch auch das SDS noch nicht ausfällt.

Nun wurden hinzugegeben (aus dem ClickIt™-Kit):

- 49 μl 18 M Ω Wasser
- 80 μl O-GlcNAc Enzymatic labeling buffer
- 11 μl MnCl_2 100 mM *kurz zentrifugiert und aufgewirbelt*

und außer zur Negativkontrolle des weiteren:

- 10 μl UDP-GalNAz in 10 mM HEPES Puffer, pH 7,9 *mit der Pipette gemischt*
- 7,5 μl Gal-T1 (Y289L) *mit der Pipette gemischt*

Die Lösung wurde über Nacht auf dem Karussell bei 4 °C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde α -chrysalin genutzt. Zu 4 μ l 5 M α -chrysalin in 4 μ l 1 % SDS, 20 mM HEPES pH 7.9 werden gegeben:

- 4,5 μ l 18 M Ω Wasser
- 8 μ l O-GlcNAc *Enzymatic labeling buffer*
- 1,5 μ l MnCl₂ 100 mM *kurz zentrifugiert und aufgewirbelt*
- 1 μ l UDP-GalNAz in 10 mM HEPES Puffer, pH 7,9 *mit der Pipette gemischt*
- 1 μ l Galaktose (GAL)-T1 (Y289L) *mit der Pipette gemischt*

Am nächsten Tag wurde die Präzipitation, wie zuvor beschrieben, wiederholt, um das Enzym sowie die überschüssige GalNAz auszuwaschen. Die verbleibenden Proteine wurden in 50 μ l 1 % SDS 50 mM Tris HCL pH 8,0 resuspendiert. Erneut wurde erhitzt und aufgewirbelt, bis sie vollständig gelöst waren. Nun wurden zur hinzugegeben:

- 100 μ l Click-iT™ *reaction buffer* + Biotin Alkyne
- 10 ml 18 M Ω Wasser *5 sec aufgewirbelt*
- 10 μ l CuSO₄ 40 mM *5 sec aufgewirbelt*
- 10 μ l Click-iT™ *reaction buffer additive 1* *5 sec aufgewirbelt, 3 Minuten gewartet*
- 20 μ l Click-iT™ *reaction buffer additive 2* *5 sec aufgewirbelt, Lösung wird orange*

Die Lösung wurde 1 h lang gekühlt und lichtgeschützt rotiert

- 5 μ l Dithiothreitol (DTT) 1 M werden hinzugegeben

Nun wurden die Proteine erneut präzipitiert, 15 Minuten lang lichtgeschützt getrocknet und in 50 μ l 1 % SDS 50 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert und konnten mit Probenpuffer erhitzt und in ein SDS-PAGE Gel geladen werden.

4.3 IDENTIFIZIERUNG O-GLCNACYLIERTER PROTEINE

4.3.1 Anreicherung O-GlcNAcylierter Proteine mit Streptavidin Perlen

Zur Anreicherung durch ClickIt™ mit Biotin markierter Proteine wurde an Agaroseperlen gebundenes Streptavidin genutzt. Streptavidin hat 4 Untereinheiten, welche mit einer sehr hohen Affinität von $K_a \sim 10^{15} \text{M}^{-1}$ an Biotin binden. Im Gegensatz zu Avidin ist Streptavidin nicht glycosyliert, was die Anzahl unspezifischer Bindungen minimiert [95]. Um O-GlcNAcylierte Proteine mit Streptavidin-Perlen

anzureichern wurden diese wie oben beschrieben Biotin-markiert. Nach der letzten Präzipitation wurden sie jedoch in 1,5 µl 20 % SDS unter langsamer Hinzugabe von 50 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert und anschließend auf 700 µl mit Anreicherungs-puffer (PBS 0,1 % SDS + 1 % Triton x-100) aufgefüllt. Dies geschah um die SDS Konzentration im Anreicherungs-puffer möglichst gering zu halten, sodass die Agaroseperlen keinen Schaden nahmen. Nach Zugabe von 100 µl Streptavidinperlen in H₂O wurde 120 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Perlen drei Mal mit 1 ml Anreicherungs-puffer gewaschen, leicht aufgewirbelt und eine Minute bei 200 g zentrifugiert, um die nicht gebundenen Proteine zu eluieren [284]. Anschließend wurden die Perlen 8 Minuten in 25 µl Lämmli-Puffer 2x gegeben und 8 Minuten bei 95 °C erhitzt.

4.3.2 Anreicherung O-GlcNAcylierter Proteine mit sWGA Perlen

Modifiziert nach Dehennaut, Lefebvre *et al.* [58]:

sWGA bindet spezifisch an β-GlcNAc-Reste. Im Gegensatz zu unmodifiziertem Weizenkeim-Lektin bindet es nicht an Sialinsäure [313]. Um die Anreicherung N-glycosidisch gebundenen GlcNAcs klassischer N-Glycane zu unterbinden, wurde dieses z. T. im Vorhinein durch Behandlung mit PNGase F abgespalten (vgl. [Unterabschnitt 4.3.3](#)). Für eine Anreicherung mit sWGA-Perlen wurden die Proteine wie beschrieben mit Homogenisierungspuffer (sWGA) extrahiert. Die Perlen wurden zwei Mal mit Anreicherungs-puffer für sWGA-Perlen gereinigt und je 2 Minuten mit 200 g bei 4 °C zentrifugiert. Proteinextrakt mit 200 mM Proteinen wurde mit Homogenisierungspuffer auf 200 µl Proteinlösung verdünnt. 15 µl hiervon, wurden als *input* abgenommen, die übrige Proteinlösung mit Anreicherungs-Puffer auf 1 ml verdünnt und auf 60 µl gereinigte sWGA-Perlen gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Perlen abzentrifugiert und anschließend vier Mal mit Anreicherungs-puffer gewaschen. Für die sichere Reinigung von allen nicht spezifisch gebundenen Proteinen, wurden drei weitere Elutionen mit 0,5 M GlcNAc in Anreicherungs-puffer durchgeführt. Vom Überstand der ersten Zentrifugation (nicht gebundene Proteine), der 4 Reinigungen (Reinigung 1–4), sowie der Elution mit GlcNAc (GlcNAc 1–3) wurden je 25 µl zur Seite genommen, der Rest wurde verworfen. Die sWGA-Perlen und die Überstände werden mit je 25 µl, der *input* mit 15 µl Lämmli 2X bei 95 °C 8 Minuten erhitzt.

4.3.3 Abspaltung von N-glycosidisch gebundenem GlcNAc

Für die Inkubation mit PNGase F wurden 100 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml Proteinen mit 11 µl des im Kit mitgelieferten 10x Glycoprotein Denaturierungs-Puffer für 8 Minuten bei 95 °C erhitzt und nach Abkühlen 12 µl des mitgelieferten 10x GlycoBuffer2 sowie 12 µl 10 % NP-40 und 10 µl PNGase F

hinzugegeben. Für die Negativkontrolle wurde in gleicher Weise verfahren, die PNGase F jedoch mit 10 µl 50 % Glycerin ersetzt. Als Positivkontrolle der Abspaltung diente Conalbumin [55]. Conalbumin in 1 % SDS mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde mit 1,1 µl des 10x Glycoprotein Denaturierungs-Puffer für 8 Minuten bei 95 °C erhitzt und nach Abkühlen 1,2 µl des 10x GlycoBuffer2 sowie 1,2 µl 10 % NP-40 und 1 µl PNGase F bzw. Glycerin hinzugegeben. Die Proben und die Negativkontrolle wurden bei 37 °C über zwei Stunden inkubiert.

Um N-glycosidisch gebundenes GlcNAc nach dem Transfer der Proteine im Western Blot zu eliminieren, wurden die Nitrocellulose Membranen über Nacht, bei 37 °C in 5 ml Phosphat-Puffer (pH 7.5 50 mM), mit 2500 U PNGase F, inkubiert [160].

4.3.4 Vorbereitung der Banden zur Massenspektroskopie

Die Banden der angereicherten Proteine wurden mit dem Skalpell aus dem Gel geschnitten, in kleine Würfel zerteilt und in 500 µl Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Dieser und alle weiteren Schritte wurden, um Verunreinigungen zu vermeiden, in steriler Umgebung mit Mundschutz, Haube und langen Handschuhen durchgeführt. Um die Banden zu entfärben, wurden sie mehrmals, bis die Farbe nahezu vollständig entfernt war, in 200 µl einer Lösung aus 50 % ACN und 50 % Ammoniumbicarbonat (v/v) 20 Minuten aufgewirbelt, anschließend in 100 % ACN dehydriert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Daraufhin wurden sie 1 Stunde lang mit 20 mM DTT in 50 mM Ammoniumbicarbonat reduziert und mit 100 mM Iodacetamid in 50 mM Ammoniumbicarbonat alkyliert. Nach aufeinanderfolgendem je 10 minütigem Waschen in 50 mM Ammoniumbicarbonat; 50 % ACN und 50 % Ammoniumbicarbonat 50 mM und reinem ACN, wurden die Gelstücke erneut in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Verdauung der Proteine wurden 5 mM Trypsin in 1 ml Ammoniumbicarbonat 50 mM gelöst und feinere Banden in 20 µl (100 ng Trypsin) auf stärkere 40 µl (200 ng Trypsin) für 45 Minuten bei 4 °C rehydriert. Dann wurde die nicht von den Gelstückchen aufgesogene Flüssigkeit abpipettiert, 25 mM Ammoniumbicarbonat daraufgegeben, so dass die Stückchen vollständig bedeckt waren und die Proben über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um die Peptide aus dem Gel zu extrahieren, wurde der Überstand in ein leeres Röhrchen gegeben und 50 µl eines Puffers aus 45 % ACN, 45 % Wasser und 10 % Ameisensäure auf die Gelstückchen gegeben. Nach 15 Minuten kräftigem Aufwirbeln, wurde der Puffer zu dem Überstand in das Röhrchen gegeben. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt [110]. Die Gelstückchen wurden bei -80 °C als Kontrolle aufgehoben, der Puffer mit den extrahierten Peptiden in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Reinigung der Peptide wurden Zip-Tip® C₁₈ Pipettenspitzen verwendet. Diese speziellen Pipettenspitzen haben ein Medium eingebettet, welches kleine Proteine und Oligopeptide bindet. Durch Aufnehmen der Proben und mehrfaches Spülen lassen sich Salze und Rückstände von Reinigungsmitteln auswaschen und hiernach die

aufgereinigten Peptide eluieren. Hierzu wurden die Pipettenspitzen aufeinanderfolgend mit zwei Mal 10 µl ACN, 10 µl 50 % ACN in 0,1%iger Ameisensäure und dreimal 10 µl 0,1%iger Ameisensäure äquilibriert. Anschließend wurden 10 µl der Probe zehn Mal aufgezogen und in das Röhrchen zurückgegeben. Die ungebundenen Verunreinigungen wurden durch 20-faches Aufnehmen von 10 µl 0,1%iger Ameisensäure ausgewaschen. Schließlich wurden die Peptide mit drei Mal 10 µl 50 % ACN in 0,1%iger Ameisensäure in ein frisches Röhrchen eluiert. Die Proben wurden nun erneut in der Vakuumzentrifuge getrocknet und massenspektroskopisch analysiert.

4.3.5 Massenspektroskopie

Die Identifizierung der Proteine erfolgte über Flüssigchromatographie (LC) mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS). Die Nano-LC MS/MS-Tandem-Massenspektrometrie wurde in einem HPLC-System Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit zwei LC-20AD *nano-flow* LC Pumpen durchgeführt: Ein SIL-20 AC *auto-sampler* und LC-20AB *micro-flow* LC Pumpe (Shimadzu, Kyoto, Japan), gekoppelt an ein Ionenfallen Massenspektroskop, welches mit einer Stoßgas Ionenfalle ausgerüstet war (amaZon ETD, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Zur Bedienung und Kopplung des Shimadzu CBM-20A Steuerungsinterface (Shimadzu, Kyoto, Japan) wurde HyStar (Version 3.2, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) genutzt. Das *trapping* und die Entsalzung der Peptide geschah in einer *nano trapping* Säule (Zorbax 300SB-C18, 5 µm, 0,3 × 5 mm, Agilent) in einer Lösung von 0.05 % (v/v) Trifluoressigsäure über 10 min bei einer Flussrate von 10 µl/min. Nach dem Auswaschen aus der Säule wurden die Peptide in einer ACQUITY UPLC® M-Class Peptide BEH C18 Reverse-Phase-Säule (1.7 µm, 130 Å, 100 × 0.75 mm i.d., Waters) aufgetrennt. Hierfür wurde über 30 min ein Gradient von 15–50 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) Ameisensäure aufgebaut. Eine feingradige Einstellung der Parameter erfolgte über die *smart parameter setting* Option bei einem *m/z*-Verhältnis von 800. *Compound stability* und *trap drive level* wurden auf 100 % eingestellt. Das Stoßgas war auf eine Temperatur von 150 °C bei einer Flussrate von 3,0 L/min eingestellt. Die Kapillarspannung lag bei 1200 V mit einem *end plate offset* von 0 V. Das Nachweisfenster für die Ionen-Detektion betrug für MS₁ und MS₂ *m/z* 100–1700. Die fünf höchstgeladenen Spannungsspitzen die nicht von Einzelladungen ausgingen wurden in jedem MS₁ Spektrum automatisiert durch Kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) fragmentiert.

4.4 BIOINFORMATISCHE METHODEN

4.4.1 Auswertung der LC-MS Ergebnisse mit Mascot

Die LC-MS Ergebnisse wurde mit Hilfe der DataAnalysis 4.1 Software (Bruker Daltonics) analysiert. Mithilfe der Compounds-AutoMS(n)-Funktion des Programmes wurde ein 1200 *compound* Spektrum erstellt und die Daten als mascot generic files exportiert. Diese wurde auf den Mascot Server (MASCOT free version, Matrix Science, London, UK), in eine „MS/MS ions search“ Suchmaske hochgeladen und anhand der Swiss Prot Datenbank (2016_07) ausgewertet. Es wurden folgende Parameter genutzt:

taxonomy: *Plasmodium falciparum* (malaria parasite),

database: SwissProt,

enzyme: trypsin,

fixed modifications: carbamidomethyl (C),

variable modifications: oxidation (M,HW), deamidation (NQ), phosphorylation (ST), pyroGlu (N-term E), and HexNAc (ST),

max missed cleavages: 1,

MS1 peptide tolerance: $\pm 0,6$ Da,

MS/MS tolerance: $\pm 0,6$ Da,

peptide charge: +2.

Nur die Ergebnisse mit einem zu der analysierten Bande passenden Molekulargewicht und einem Signifikanten *mascot score* wurden ausgewählt.

4.4.2 Ermittlung potentieller O-GlcNAc Stellen mit YinOYang 1.2

Die Aminosäuresequenzen der identifizierten Proteine wurden aus der Swiss Prot Datenbank (2016_07) übernommen und in YinOYang 1.2 <https://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/> auf potentiell O-GlcNAcylierte Stellen untersucht. Der Prediction Server YinOYang 1.2 errechnet potentiell O-GlcNAcylierte Stellen anhand der Daten aus 40 experimentell bestimmten O-GlcNAc Stellen. Als Kriterien dienen die engen Lagebeziehungen von Serin und Threonin zu Prolin und Valin, das Vorkommen eines in C-Terminus gelegenen serinreichen Abschnitts und die Abwesenheit von Leucin und Glutamin in unmittelbarer Nähe. Stellen die potentiell neben der O-GlcNAcylierung auch phosphoryliert sein könnten, werden über Abgleich mit dem NetPhos-Server <https://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> bestimmt. Dem Potential der ermittelten Stellen wird anhand der Abweichung von definierten Schwellenwerten ein *score* von (+) bis (+++++) gegeben [108][109]. Das Programm wurde für Humanproteine geschrieben und zeigte für bisher experimentell als O-GlcNAcyliert verifizierte Stellen eine Sensibilität von 44–50 % [140].

4.5 CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER UDP-GLCNAC KONZENTRATION

4.5.1 *Extraktion und Entsalzung der Proben*

Zur chromatografischen Bestimmung der UDP-GlcNAc Konzentration wurden die tiefgefrorenen Parasiten-Pellets in 550 ml hypotonischem Puffer gelöst. Auf das Pellet werden 1ml Puffer mit 1 % Proteaseinhibitor gegeben. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 20.000 G und 4 °C wird der Überstand abgenommen.

Der Überstand wird aufgeteilt, 30 ml werden für die Bestimmung der Proteinkonzentration zur Seite genommen (vgl. 4.2.2 auf Seite 53). Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen wird der zu bestimmende Überstand hierbei nicht verdünnt sondern unverdünnt in die 96-well Platte gegeben. 500 ml werden aufgereinigt.

Zur Herstellung des Entsalzungsfilters wurde eine Pasteurpipette mit reiner Watte verschlossen. Darauf wurden ca. 1 ml Dowex (50Wx2, H+ Sigma-Aldrich) gegeben. Der so entstandene Filter wurde mit 5 ml 18 MΩ Wasser gespült. Die 500 ml in Puffer gelöste Proteine wurden in zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt und je mit 250 ml 18 MΩ Wasser bzw. 10 nmol UDP-GlcNAc gelöst in 18 MΩ Wasser versetzt. Diese beiden Proben wurden mit 25 µl HCl 1M versetzt, in die Pasteurpipette gegeben und in einem in Eis gelagerten 15 ml *Falcon*-Röhrchen mit 0,25 ml Tris/HCl (pH 8,0) aufgefangen. Sobald die Lösung vollständig durchgelaufen war, wurde mit 18 MΩ Wasser (4 °C) nachgespült, bis ein Endvolumen von 3 ml im *Falcon*-Röhrchen erreicht war. Nach kurzem Aufwirbeln wurden die 3 ml durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter gefiltert und in 2 Aliquote à 1,5 ml aufgeteilt. Für die *Medical Research Council cell strain 5* (MRC-5) Zellen wurde ein Endvolumen von 10 ml gefiltert.

4.5.2 *Erstellung der Nukleotid Standards*

Zur Ermittlung der Retentionszeit der einzelnen Nukleotidbasen, wurden in 18 MΩ Wasser gelöste Nukleotidbasen und Nukleotidzucker in einer Konzentration von 10 nmol/ml angefertigt. Untersucht wurden folgende Basen:

NUKLEOTIDBASE	MOLEKULARGEWICHT [G/MOL]	MMOL IN 1 ML
UMP 10 nmol	368,15	3,68
UDP 10 nmol	448,12	4,48
GlcNAc 10 nmol	345,15	3,45
UDP-GALNAc 10 nmol	651,32	6,51
ADP-Glc 10 nmol	633,31	6,33
UDP-GlcNAc 10 nmol	651,32	6,51
UDP-GlcNAc 4 nmol	651,32	2,53
UDP-GlcNAc 2 nmol	651,32	1,27
UDP-GlcNAc 1 nmol	651,32	0,63
UDP-GlcNAc 0,5 nmol	651,32	0,32
UDP-GlcNAc 0,25 nmol	651,32	0,16

Die so gewonnenen Standards wurden auf die oben beschriebene Art entsalzt.

4.5.3 Chromatografische Konzentrationsbestimmung

Je 1,5 ml der verdünnten Fraktionen wurden über eine 1 ml Dosierschleife in das ÄKTA Purifier 10 System injiziert sodass eine vollständige Füllung der Schleife gewährleistet war. Die Elution erfolgte in stark alkalischem Milieu, die Auftrennung in einer ProPAC-PA1 column (4 × 250 mm) Trennsäule.

Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,8 mL nach folgendem Protokoll:

Beginn mit Eluent A (20 mM Tris/HCl, pH 9.2) über 1 min.

Aufbau eines Gradienten mit 85 % Eluent A und 15 % Eluent B (2 M NaCl).

Halten dieser Konditionen über 5 min.

Aufbau des Gradienten auf 100 % Eluent B über 10 min.

Halten dieser Konditionen über 5 min.

Erneute Äquibrierung der Säule auf in 100 % Eluent A.

Die Entgasung der Eluenten erfolgte über Heliumeinleitung in das Vorratsgefäß.

Die Detektion erfolgte bei 256 nm.

4.6 INKUBATION MIT THIAMET-G

4.6.1 Anfertigung der Kulturen

Für die Inkubation mit Thiamet-G wurde eine Lösung des OGA Inhibitors in einer Konzentration von 10 mM angefertigt. Plasmodienkulturen wurden in 12-well Platten angelegt, wobei das Gesamtvolumen pro well 4 ml betrug. Die Kulturen wurden mit einem Hämatokrit von 5 % wie in [Abschnitt 4.1](#) beschrieben angelegt. Jedoch

wurde bei je zwei dieser *wells* 80 μ l, 40 μ l, 12 μ l, bzw. 4 μ l der 3,6 ml Nährstoffmedium durch die Inhibitorlösung ersetzt, sodass in je zwei Kulturen eine Inhibitorkonzentration von 200 mM, 100 mM, 30 mM bzw. 10 mM vorherrschte. Die übrigen vier *wells* dienten als Kontrolle. Beim Splittieren wurde erneut Inhibitor hinzugegeben, sodass die Konzentration aufrecht erhalten blieb.

4.6.1.1 *Bestimmung der Parasitämie*

In 24 h Abständen wurden Kontrollausstriche aller *wells* wie in [Unterabschnitt 4.1.2](#) beschrieben angefertigt. Von diesen Ausstrichen wurden mit einem Digitalen Mikroskop (EVOS XL core) je vier Aufnahmen jedes Ausstriches angefertigt. Über diese Aufnahmen wurde ein Raster gelegt und das Verhältnis zwischen infizierten und uRBCs händisch ausgezählt. Aus den Werten der Aufnahmen der Ausstriche aller Kulturen mit der gleichen Inhibitorkonzentration wurde für jeden Tag der Durchschnittswert berechnet. Zudem wurden mit den Daten für jeden Zeitpunkt ein *t*-Test aller Auszählungen der verschiedenen Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Boxplot dargestellt.

ERGEBNISSE

5.1 DARSTELLUNG DES O-GLCNACOMS VON *P. FALCIPARUM*

Zur Darstellung des O-GlcNAcylierten Anteils des Proteoms, dem „O-GlcNAcom“, wurden verschiedene Herangehensweisen und Techniken genutzt. Zum einen die Inkubation mit O-GlcNAc spezifischen Antikörpern, zum anderen die enzymatische Koppelung mit Hilfe der *click-chemistry* und die Reinigung der Proteine über Bindung an sWGAs.

5.1.1 Inkubation mit dem Antikörper RL2

Die Vorzüge des für endständiges O-GlcNAc spezifischen Antikörpers RL2 gegenüber vergleichbaren Antikörpern ist in [Unterabschnitt 4.2.6](#) dargelegt. Er wurde zur Darstellung O-GlcNAcylierter Proteine zum Vergleich unterschiedlicher Proteinextraktionstechniken, sowie zur orientierenden Darstellung des O-GlcNAcoms verwendet.

Um zu sicherzustellen, ob die relativ labilen PTMs den Transport der Proben auf Trockeneis, sowie den Prozess der Extraktion gut überstehen, wurden Rohextrakte der Proben, also die in PBS gereinigten Parasiten, direkt mit Lysepuffer erhitzt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot übertragen. Die Blots wurden mit dem Antikörper inkubiert und die gebundenen Proteine per Chemilumineszenz dargestellt. Die in [Abbildung 5](#) dargelegten kräftigen Signale zeigen, dass die Modifikationen alle der Proteinextraktion vorangegangenen Arbeitsschritte gut überstanden haben.

Zum Vergleich unterschiedlicher Extraktionsverfahren der Proteine wurde ebenfalls die Inkubation mit RL2 genutzt. Hierbei wurden sowohl die verschiedenen, für die Extraktion genutzten Pufferlösungen untersucht, als auch die Auswirkung des zusätzlichen Aufbrechens der Pellets im Ultraschallbad auf die O-GlcNAcylierung. Weiterhin war von Interesse, ob der Vorteil der erhöhten Ausbeute an Proteinen, die durch diese Methode extrahiert werden, durch einen größeren Verlust an O-GlcNAcylierung aufgehoben würde. Daher wurden gleiche Proteinkonzentrationen mit und ohne Ultraschallexposition mit RL2 inkubiert und die Intensität der Chemilumineszenz-Aufnahmen verglichen. Hier konnte kein Unterschied festgestellt werden. Daher wurde davon ausgegangen, dass durch die Ultraschallbehandlung die PTM nicht nennenswert beeinflusst wird und diese Art der Extraktion dar-

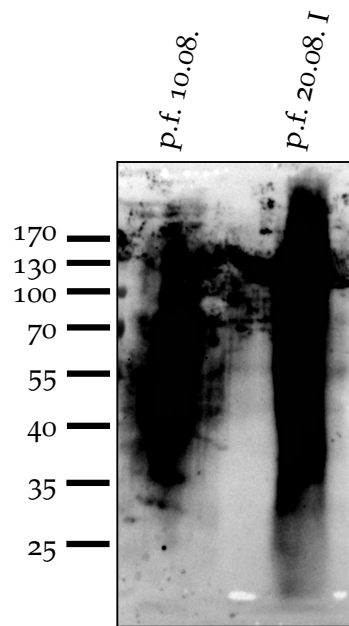


Abbildung 5: Inkubation zweier *P. falciparum* Rohextrakte mit dem O-GlcNAc-spezifischen monoklonalen Antikörper RL2 zum Nachweis von O-GlcNAcylierung vor der Proteinextraktion

aufhin standardmäßig genutzt. Eine grobe Darstellung des O-GlcNAcoms durch Inkubation mit RL2 zeigt [Abbildung 6](#).

5.1.2 Enzymatische Kopplung durch Click-chemistry

Das „Click-iT™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System“ ermöglicht die enzymatische Kopplung azido-modifizierten *N*-Acetylgalactosamins (GalNAz) an O-GlcNAc. Hierfür wird die mutierte β -1,4-Galaktosyltransferase Gal-T 1 (Y289L) benutzt. Das modifizierte GalNAc hat an seiner Acetylgruppe einen Tristickstoff gebunden. Dieses Azidradikal kann über kupferkatalysierte Cycloaddition an alky gebundene Moleküle gekoppelt werden. Dieses Verfahren hat mehrere Vorteile: Durch die selektive Reaktion zwischen Alkyn- und Azidgruppen, welche quasi nicht mit anderen organischen Gruppen interagiert, ist sie sehr selektiv. Zudem kommen diese beiden Gruppen nicht in nativen Biomolekülen vor, sodass ausschließlich Moleküle markiert werden, auf die GalNAz übertragen wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Reaktion in wässrigen Lösungen und somit sehr schonend ablaufen kann. [8] In dieser Arbeit wurde alky gebundenes Biotin genutzt, welches im Western Blot mit Streptavidin dargestellt wurde. Der Reaktionsablauf ist in [Abbildung 7](#) dargestellt.

Da das modifizierte GALNAC Gal-T 1 auch auf *N*-glycosidisch gebundenes GlcNAc transferiert wird, wurden die Proben vor Durchführung der enzymatischen Markierung mit PNGase F inkubiert, um eventuell *N*-glycosidisch gebundenes GlcNAc abzuspalten. Als Positivkontrolle der Abspaltung wurde Conalbumin

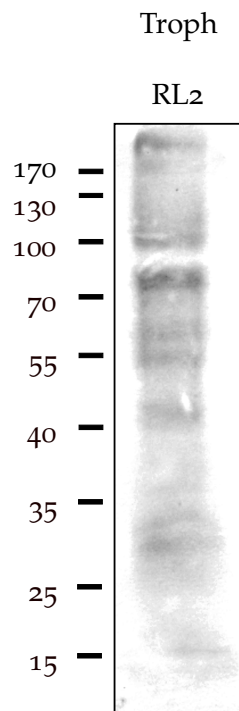


Abbildung 6: Darstellung des O-GlcNAcoms durch die O-GlcNAc-spezifischen monoklonalen Antikörper RL2.

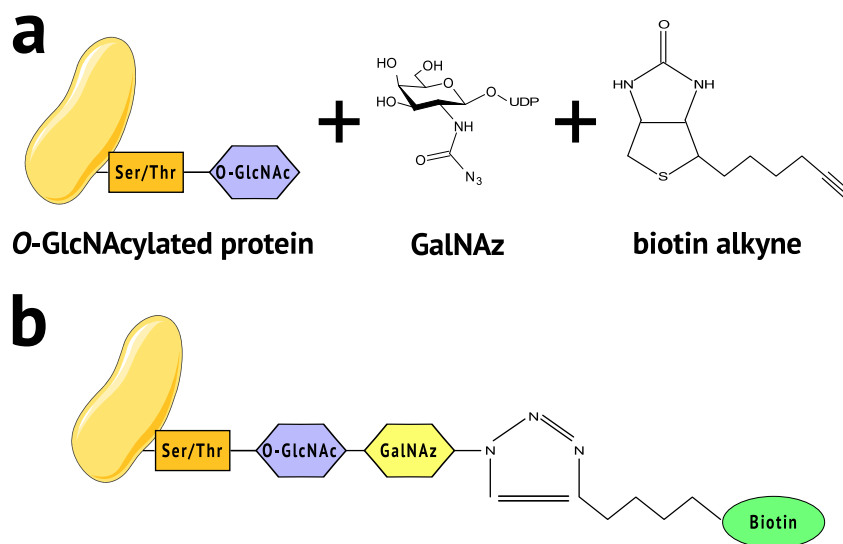


Abbildung 7: Funktionsweise *click-chemistry*:

Über eine mutierte β -1,4-Galaktosyltransferase wird Azido-modifiziertes GalNAc auf O-GlcNAc übertragen. Alkyliertes Biotin wird in kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition an die Azidgruppe gebunden

verwendet, ein Glycoprotein des Hühnereiweises, welches *N*-glycosidisch gebundenes GlcNAc besitzt. Bei dem mit PNGase F inkubierten Conalbumin zeigte sich im Western Blot keine Bande, in der Positivkontrolle eine sehr starke (vgl. [Abbildung 8](#) rechtsseitig). Die Inkubation war demnach erfolgreich. Die *P. falciparum*-Probe zeigte keinen sichtbaren Unterschied nach Inkubation mit PNGase F, was aufgrund des fraglichen Vorkommens bzw. der Unterdrückung von *N*-Glycosylierung im Proteom des Parasiten nicht weiter verwunderlich ist (vgl. [Unterabschnitt 1.2.12](#)). Die sichtbaren Banden der Proben ohne Durchführung der *click-chemistry* sind auf originäre Biotinylierungen der Proteine zurückzuführen. Die *O*-GlcNAcylierten Proteine lassen sich somit aus der Differenz der Banden mit und ohne *click-chemistry* herleiten. Hier sind einige Banden ausschließlich nach der Biotinylierung von *O*-GlcNAc sichtbar werden (vgl. [Abbildung 8](#) linksseitig). Mit dieser Technik war somit das Vorhandensein von *O*-GlcNAcylierten Proteinen bei *P. falciparum* ebenfalls erfolgreich nachweisbar.

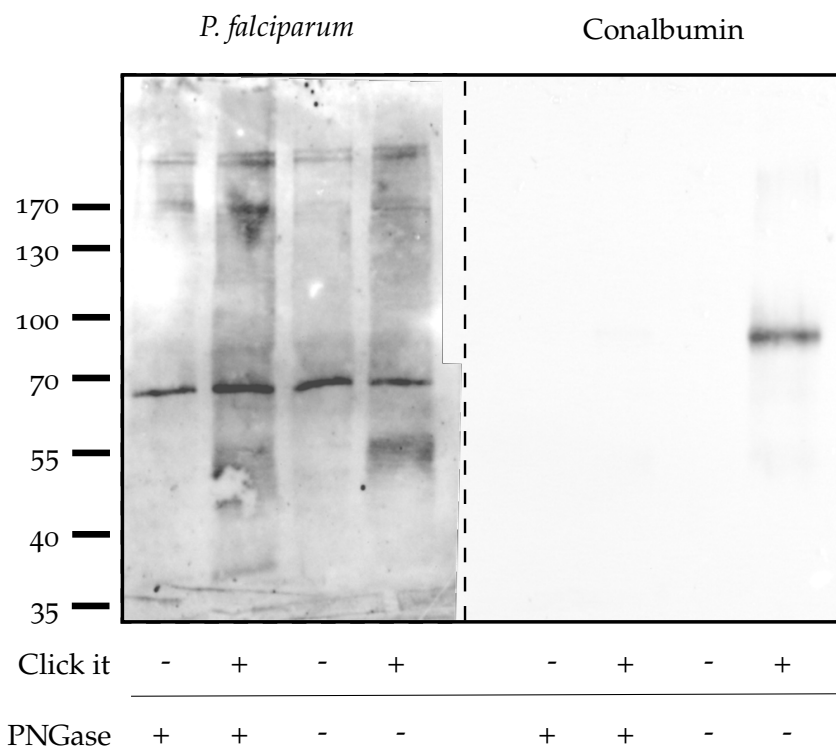


Abbildung 8: Darstellung des *O*-GlcNAcoms durch *click-chemistry*:

Western Blot mit Stepavidin (links: 3 min Super Signal® West Femto Maximo, rechts: 18 sec. Pierce® ECL 2 Western Blotting Substrate)

Links: *P. falciparum* jeweils mit und ohne Abspaltung der *N*-Glycosylierung durch PNGase F und Biotinylierung von *O*-GlcNAc durch *click-chemistry*. Rechts: Conalbumin als Kontrolle der erfolgreichen Abspaltung der *N*-Glycane durch PNGase F.

Die Banden der *click-chemistry* negativen Proben zeigen biotinylierte Proteine. Die *click-chemistry* positiven Proben zeigen deutlich mehr Banden. Dies sind *O*-GlcNAcylierten Proteine.

Mit der gleichen Herangehensweise wurde auch der Unterschied in der O-GlcNAcylierung der verschiedenen Stadien dargestellt. Es wurden Proben genutzt, die aus zuvor, wie in [Unterabschnitt 4.1.4](#) beschrieben, magnetisch aufgetrennten Parasitenkulturen gewonnen wurden. Dies ermöglichte die Gegenüberstellung des O-GlcNAcylierten Proteoms von Parasiten, die sich überwiegend im Ring- bzw. im Trophzoitenstadium befinden. Es zeigten sich die in [Abbildung 9](#) abgebildeten, divergenten Bandenmuster.

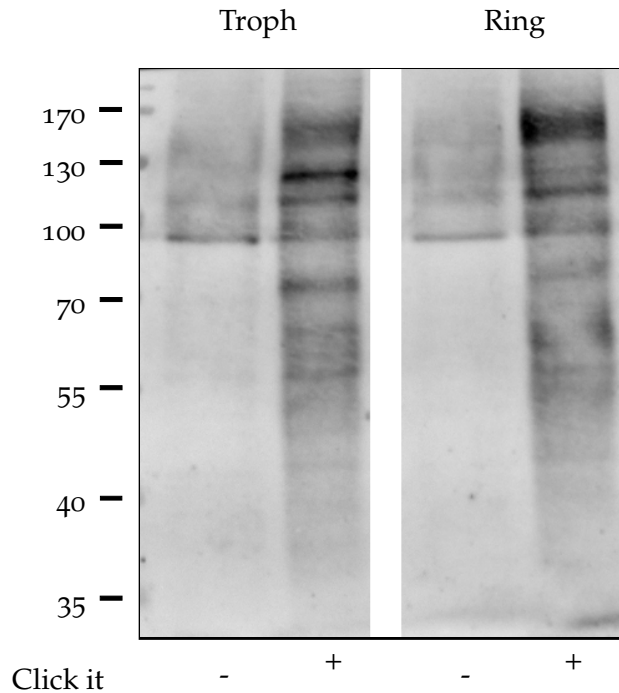


Abbildung 9: Das O-GlcNAcylierte Proteom in verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten:

(Western Blot mit Stepavidin)

Es zeigt sich eine deutliche Veränderung der Zusammenstellung O-GlcNAcylierter Proteine, zwischen dem Trophozoiten und dem Ringstadium von *P. falciparum*.

5.1.3 Bindung an sWGA

Eine andere Herangehensweise die zur Darstellung des O-GlcNAcoms von *P. falciparum* genutzt wurde, war die Anreicherung der Proteine über Bindung an sWGA. Das Lektin bindet spezifisch an β -GlcNAc-Reste. Erneut wurden zum Spalten eventuell vorliegender N-Glycosylierung, an die das Lektin binden könnte, die Proben zuvor in einer Lösung mit PNGase F inkubiert. Nach Inkubation mit den sWGA-Agarose-Perlen wurden die ungebundenen Proteine eluiert. Ein Rohextrakt sowie die angereicherten und eluierten Proteine wurden in einem Gel aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt. Es zeigte sich das in [Abbildung 10](#) dargestellte Profil. So

konnte durch eine dritte Technik das Vorhandensein von O-GlcNAcylierung bei *P. falciparum* nachgewiesen werden.

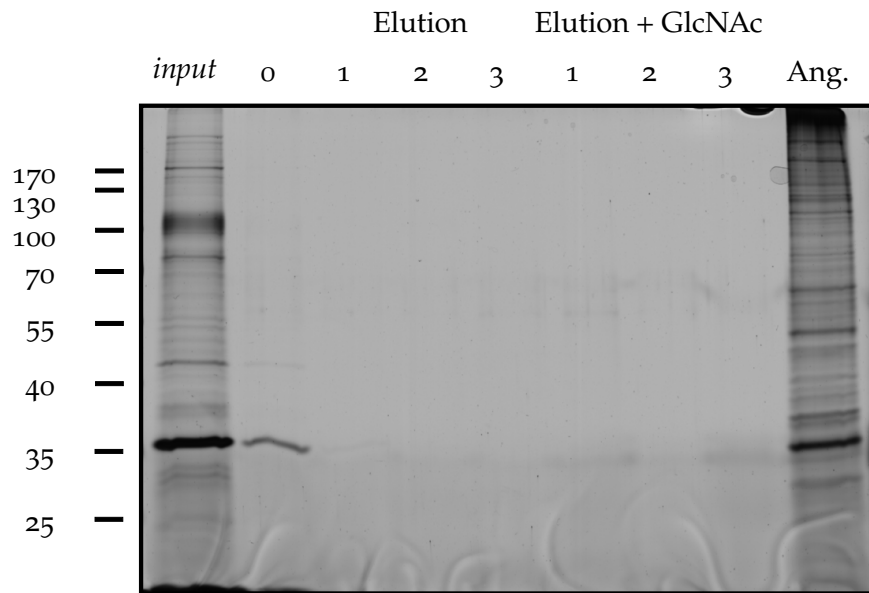


Abbildung 10: Darstellung des O-GlcNAcoms durch Bindung an swGA:

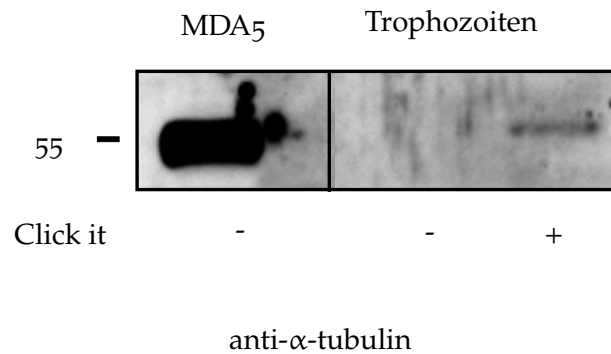
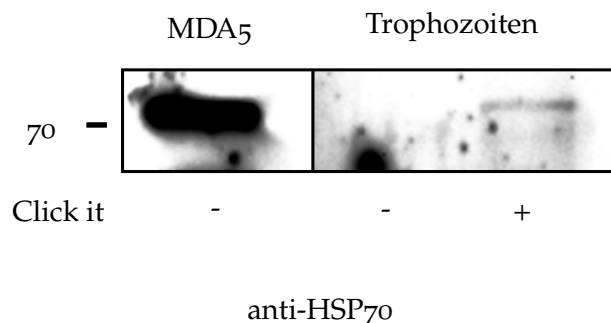
(8 % SDS-PAGE-Gel mit Silbernitratfärbung)

input: Rohextrakt vor der Anreicherung; Elution 0–3: Überstand nach Abzentrifugieren nach der Inkubation und den Elutionen mit Pufferlösung; Elution + GlcNAc 1–3: Überstand nach Abzentrifugieren nach Elutionen mit Pufferlösung und 0,5 M GlcNAc; Ang.: Angereicherte (O-GlcNAcylierte) Proteine. Es zeigt sich eine Vielzahl O-GlcNAcylierter Proteine

5.2 IDENTIFIZIERUNG O-GLCNAC-MODIFIZIERTER PROTEINE

5.2.1 Nachweis O-GlcNAcylierter Proteine über spezifische Antikörper

Für die Bestimmung O-GlcNAcylierter Proteine über Antikörper wurden die Proben, wie in [Unterabschnitt 5.1.2](#) dargelegt, biotinyliert und anschließend mit Streptavidin-Agaroseperlen angereichert, nach Eluierung in ein Gel geladen und im Western Blot übertragen. Daraufhin wurden sie mit anti- α -Tubulin und anti-Hsp70 inkubiert. Es zeigte sich, dass bei *P. falciparum* sowohl α -Tubulin als auch Hitzeschockprotein (HSP)70 durch O-GlcNAc-modifiziert sind (vgl. [Abbildung 11](#) und [Abbildung 12](#)).

Abbildung 11: O-GlcNAcylierung von α -Tubulin bei *P. falciparum*Abbildung 12: O-GlcNAcylierung von HSP70 bei *P. falciparum*

5.2.2 Auswahl O-GlcNAcylierter Proteine für die Massenspektroskopie

Der Ansatz des Nachweises O-GlcNAcylierter Proteine über spezifische Antikörper hat mehrere Nachteile. Es setzt die Vermutung voraus, welche Proteine O-GlcNAc-modifiziert sein könnten, um diese gezielt zu suchen. Zudem benötigt man die spezifischen Antikörper, die zudem mit *P. falciparum* Proteinen reagieren müssen. Um eine möglichst hohe Anzahl, auch unerwarteter, Proteine bestimmen

zu können, wurden im nächsten Ansatz verschiedene Anreicherungsmethoden mit Massenspektroskopie-Identifizierung kombiniert.

5.2.2.1 Anreicherung über Streptavidin-Agaroseperlen nach click-chemistry

Click-modifizierte Proteine wurden mit Avidinperlen angereichert und in ein Gel geladen, welches mit koloidalen Coomassie-Blau gefärbt wurde. Die Hälfte der Probe wurde nicht biotinyliert und diente als Kontrolle. O-GlcNAcylierte Proteine stellten sich als Bande ausschließlich bei den Proben nach *click-chemistry* dar. Originär biotinylierte Proteine zeigten sich auch bei der Kontrolle (vgl. [Abbildung 13](#)). Entsprechend wurden die Banden ausgewählt, ausgeschnitten und für die Massenspektroskopie vorbereitet. Die Hälfte der Probe wurde nicht biotinyliert und diente als Kontrolle. O-GlcNAcylierte Proteine stellten sich als Bande ausschließlich bei den Proben nach *click-chemistry* dar. Originär biotinylierte Proteine zeigten sich auch bei der Kontrolle (vgl. [Abbildung 13](#)). Entsprechend wurden die Banden ausgewählt, ausgeschnitten und für die Massenspektroskopie vorbereitet.

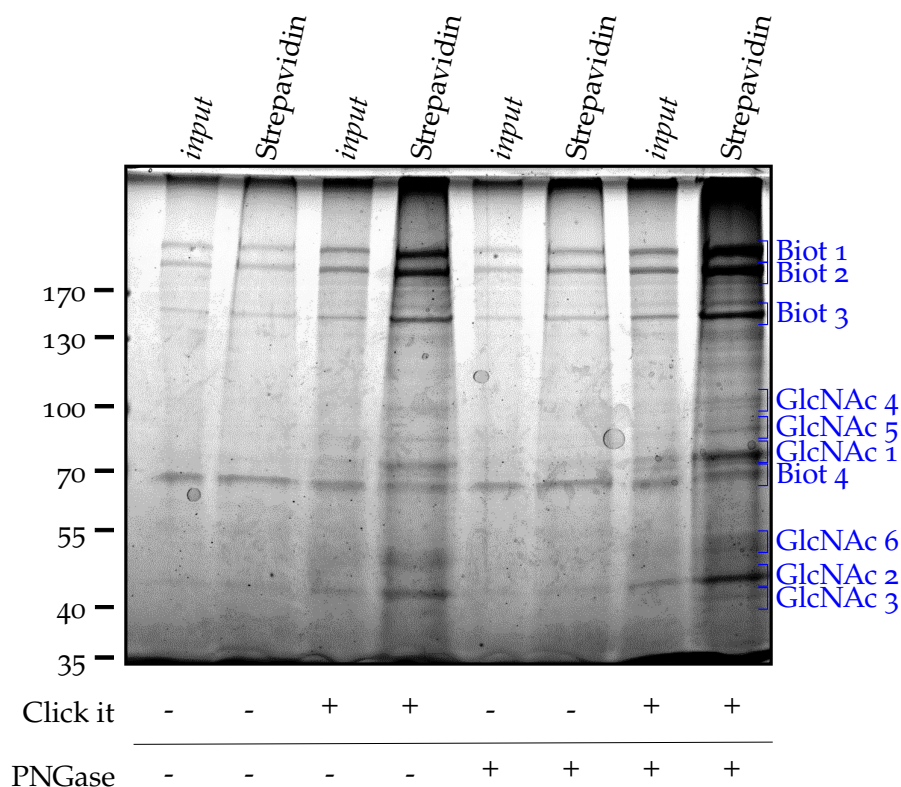


Abbildung 13: Anreicherung O-GlcNAcylierter Proteine nach *click-chemistry*:

(8 % SDS-PAGE-Gel mit Coomassie-Blau Färbung)

input: Proteine vor der Anreicherung mit Streptavidin in geringer Konzentration. Banden die auch bei *click-chemistry*-negativen Proben erscheinen sind originär biotinyliert (Biot. 1–4). Nur Banden die ausschließlich nach der Biotinylierung mit *click-chemistry* nachweisbar sind, sind O-GlcNAcyliert (GlcNAc 1-6). Diese wurden für die Massenspektroskopie ausgewählt.

5.2.2.2 Anreicherung über Bindung an sWGA

Bei der Anreicherung O-GlcNAcylierter Proteine über die Bindung an sWGA, wurde annähernd gleich vorgegangen, wie bei der Darstellung der Proteine durch diese Methode. Ein Unterschied war die Auftrennung der Proteine in einem SDS-Page Gel mit einem Gradienten von 12,5%–8%, sodass auch Proteine mit einer Größe unter 15 kDa noch im Gel verblieben. Zudem wurde das Gel aus technischen Gründen nicht mit Silbernitrat sondern mit einer koloidalen Coomassie-Blau-Färbung eingefärbt. Die sichtbaren Banden wurden ausgeschnitten und für die Massenspektroskopie vorbereitet (vgl. [Abbildung 14](#)).

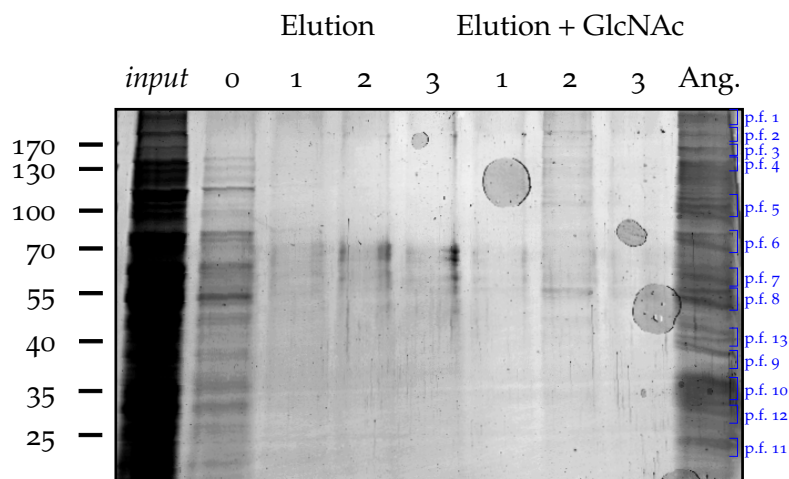


Abbildung 14: Anreicherung O-GlcNAcylierter Proteine durch Bindung an sWGA:
(12,5%–8% SDS-PAGE-Gel mit Coomassie-Blau Färbung)

Input: Rohextrakt vor der Anreicherung; Elution 0–3: Überstand nach Abzentrifugieren nach der Inkubation und den Elutionen mit Pufferlösung; Elution + GlcNAc 1–3: Überstand nach Abzentrifugieren nach Elutionen mit Pufferlösung und 0,5 M GlcNAc; Ang.: Angereicherte (O-GlcNAcylierte) Proteine.

Die sichtbaren Banden mit O-GlcNAcylierten Proteinen wurden ausgeschnitten und für die Massenspektroskopie vorbereitet

5.2.3 Identifizierung des O-GlcNAcoms in der Massenspektroskopie

Die ausgewählten Banden, die über die verschiedenen Anreicherungsmethoden gewonnen wurden, wurden trypsiniert, gereinigt und in (LC-MS) Tandem-Massenspektrometrie mit einem amaZon ETD Massenspektrometer bestimmt. Nach Ausgabe wurden die Daten in der Suchmaske des frei zugänglichen Mascot-Servers taxonomisch auf *P. falciparum*-Proteine hin untersucht. Alle Ergebnisse, deren Molekulargewicht außerhalb der ausgeschnittenen Bande lag, wurden ausgeschlossen; ebenso Ergebnisse mit einem *mascot-score* von unter 30. Auf diese Weise konnten 17 Proteine mit wahrscheinlicher O-GlcNAcylierung identifiziert werden (vgl. [Tabelle 1](#)). Von diesen können 4 dem Kohlenhydratmetabolismus bzw. speziell der Glykolyse zugerechnet werden, 5 sind Proteine des Cytoskeletts, 3 Chaperone, die verbleibenden 5 Proteine nehmen diverse, teilweise unbekannte Funktionen (2) ein (vgl. [Abbildung 15](#)). Obwohl sich bei der Anreicherung mit sWGA mehr Banden darstellten als bei *click-chemistry* (12 vs. 6 Banden), stellte sich letztere Methode als die sensitivere für die Identifikation O-GlcNAc-modifizierter Proteine heraus (13 vs. 9 identifizierte Proteine). Fünf Proteine konnten durch beide Methoden identifiziert werden (Actin 1, Elongation factor 1, HSP70, α -Tubulin und das 78 kDa *glucose-regulated protein* (GRP-78)).

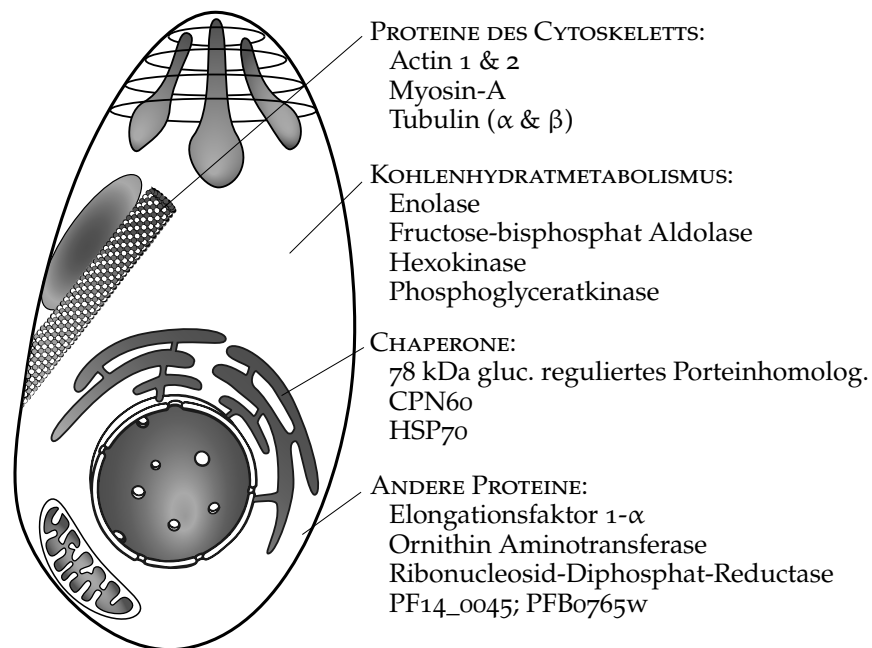


Abbildung 15: Die in der Massenspektroskopie identifizierten Proteine nehmen Funktionen in verschiedenen Systemen der Struktur und des Metabolismus von *P. falciparum* ein.
Modifiziert nach [12] und [92]

Tabelle 1: Liste der in der Massenspektroskopie identifizierten Proteine

ZUGANGSNUMMER (UniProtKB)	SCORE (max.)	COVERAGE (max.)	MASS	MATCHES	SEQUENCES	VOLLER NAME	REFERENZEN
CLICK-CHEMISTRY UND sWGA							
GRP78_PLAFO	1864	27,00 %	72845	49 (46)	22 (21)	78 kDa glucose-regulated protein homolog	ER-specific O-GlcNAc(eOGT, EGF repeat-specific O-GlcNAc-transferase)?
ACT1_PLAF7	169	12,00 %	42072	8 (7)	4 (4)	Actin-1	[59] (<i>Xenopus laevis</i>); [110] (human breast cancer cell line MCF7)
EF1A_PLAFK	732	23,00 %	49238	25 (21)	10 (9)	Elongation factor 1-alpha	[59] (<i>Xenopus laevis</i>); [110] (human breast cancer cell line MCF7)
HSP70_PLAFA	1889	31,00 %	74754	66 (59)	21 (20)	Heat shock 70 kDa protein =2	[110] (human breast cancer cell line MCF7); [105] (human hepatocarcinoma derived cell line HepG2)
TBA_PLAFK	75	3,00 %	51120	3 (2)	1 (1)	Tubulin alpha chain	
CLICK-CHEMISTRY							
ACT2_PLAF7	55	6,00 %	42977	6 (5)	3 (3)	Actin-2	[110] (human breast cancer cell line MCF7)
CH60_PLAFG	192	8,00 %	79738	15 (5)	8 (4)	Chaperonin CPN60, mitochondrial	[149] (rat pancreatic b-cell line Rin-m5f)
ENO_PLAFA	694	18,00 %	49015	20 (16)	8 (5)	Enolase	[59] (<i>Xenopus laevis</i>); [110] (human breast cancer cell line MCF7); [43, 289] (<i>Rattus norvegicus</i>)
ALF_PLAFA	1566	36,00 %	40479	39 (38)	15 (14)	Fructose-bisphosphate aldolase	[43] (<i>Rattus norvegicus</i>)
HXK_PLAFA	38	7,00 %	56166	4 (1)	3 (1)	Hexokinase	bisher keine
OAT_PLAFD	519	19,00 %	46938	15 (10)	9 (6)	Ornithine aminotransferase	bisher keine
PGK_PLAF7	562	29,00 %	45569	21 (21)	11 (11)	Phosphoglycerate kinase	[176] (<i>Rattus norvegicus</i>)
TBB_PLAFA	92	2,00 %	50238	1 (1)	1 (1)	Tubulin beta chain	
sWGA							
KC1_PLAF4	69	9,00 %	38036	5 (3)	3 (1)	Casein kinase I	bisher keine
MYOA_PLAFB	224	8,00 %	93017	10 (5)	7 (2)	Myosin-A	[43, 124] (<i>Rattus norvegicus</i>)
YPF02_PLAF7	35	0,00 %	114693	5 (1)	4 (1)	Uncharacterized protein PF14_0045	bisher keine
YPF11_PLAF7	42	0,00 %	167873	8 (2)	5 (1)	Uncharacterized protein PFB0765w	bisher keine

5.3 BIOINFORMATISCHE BESTIMMUNG MÖGLICHER O-GLCNACYLIERUNGS-STELLEN

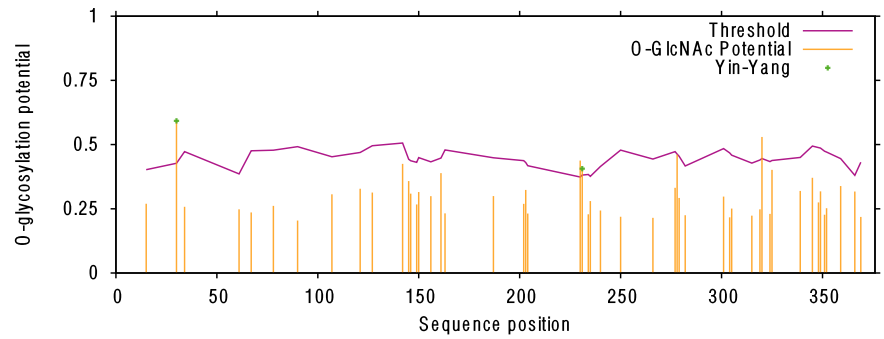
Mit dem *online-tool* YinOYang wurden die Aminosäuresequenzen einzelner Proteine auf mögliche Stellen untersucht, die als Träger von O-GlcNAc dienen können. Hier kommen Serin- und Threonin-Untereinheiten als Akzeptoren in Frage. Jedoch müssen auch andere Umgebungsfaktoren gewährleistet sein, um eine O-GlcNAcylierung zu begünstigen. So wirken sich Prolin (-4,-3,-2) N-terminal und Valin (-1,+2,+4,+5) sowie Serin (+1,+4,+7) C-terminal in der direkten Umgebung der beiden Proteine positiv, Leucin und Glutamin eher negativ auf die O-GlcNAc Modifizierbarkeit aus [109]. Der YinOYang-Server teilt entsprechende Stellen nach Wahrscheinlichkeit (+ bis +++) ein. Wobei + und ++ anhand des Überschreitens zweier (unterschiedlich strenger) Grenzwerte definiert sind. +++ und ++++ stehen für ein deutliches Überschreiten des Grenzwertes sowie eine Vorhersagewahrscheinlichkeit von über 0,75. Eine mögliche Phosphorylierbarkeit der selben Stelle wird durch einen Asterisk (*) gekennzeichnet. Für zehn untersuchte *P. falciparum*-Proteine fand sich mindestens eine Stelle mit möglichem O-GlcNAcylierungs-Potential (+). Vier Proteine (Aktin, Hsp70, Enolase, Hexokinase) zeigten ein erhöhtes Potential (++) . α - und β -Tubulin zeigten ein hohes Potential an einer Stelle ihrer Proteinsequenz. (vgl. [Tabelle 2](#), [Abbildung 16](#)).

5.3.1 Genauere Untersuchung bei α -Tubulin

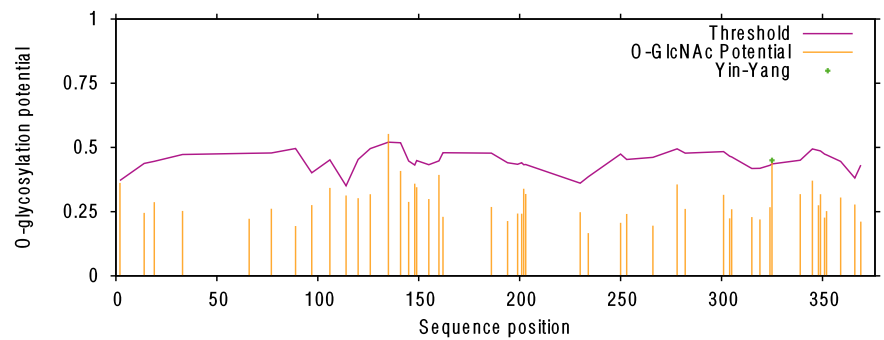
Der direkte Nachweis von gebundenem O-GlcNAc in der Massenspektroskopie wurde für wenige Proteine durchgeführt. Eines davon ist α -Tubulin [139]. Über *sequenz-alignement* konnte gezeigt werden, dass das in den vorangegangenen Untersuchungen als O-GlcNAc-modifiziert identifizierte α -Tubulin bei *P. falciparum* eine, im Gegensatz zu den als O-GlcNAcyliert bekannten, murinen Neuronenzellen MN9D, lediglich um eine Aminosäure abweichende Sequenz trägt (PSPQVSTAVVEPY, vgl. [Abbildung 17](#)). Diese Sequenz wurde in der Untersuchung über den YinOYang-Server als Stelle mit hohem O-GlcNAcylierungs-Potential (+++) bewertet. Eine weitere Stelle (Serin an Position 277) zeigt bei der Analyse ein erhöhtes Potential (++) mit Möglichkeit zur Phosphorylierung (vgl. [Abbildung 16.a](#), [Tabelle 2](#)).

Tabelle 2: O-GlcNAcylierungs-Potential der identifizierten Proteine

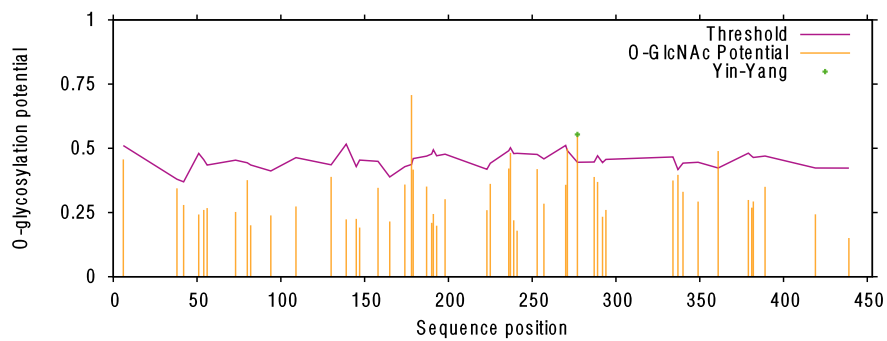
SEQNAME	RESIDUE	O-GLCNAC result	POTENTIAL (O-GlcNAc)	THRESH.(1)	THRESH.(2)	NETPHOS. POTENTIAL (Thresh=0.5)	YINYOANG?
AKTIN1:							
	30 S*	++	0,5924	0,4274	0,5265	660	*
	230 T	+	0,4379	0,3736	0,4540		
	231 S*	+	0,4062	0,3814	0,4645	774	*
	320 T	+	0,5297	0,4456	0,5511		
AKTIN2:							
	135 S	+	0,5527	0,5205	0,6520		
	325 S*	+	0,4500	0,4359	0,5380	505	*
α -TUBULIN:							
	178 S	+++	0,7073	0,4372	0,5397		
	271 S	+	0,4982	0,4909	0,6121		
	277 S*	++	0,5541	0,4456	0,5510	513	*
	361 T	+	0,4893	0,4232	0,5209		
β -TUBULIN:							
	33 S	++	0,5369	0,4158	0,5109		
	176 S	++	0,5221	0,4162	0,5114		
	230 S	+	0,5930	0,5056	0,6319		
	274 T*	+++	0,6481	0,4377	0,5404	954	*
	275 S	++	0,5553	0,4262	0,5249		
	303 S	+	0,4326	0,4217	0,5188		
	351 S	+	0,4718	0,4290	0,5287		
HSP70:							
	49 T*	++	0,5352	0,4293	0,5290	867	*
	92 S*	+	0,4683	0,4668	0,5796	935	*
	170 T*	+	0,4006	0,3958	0,4839	668	*
	286 T	+	0,4693	0,4228	0,5203		
	394 S	+	0,5058	0,4711	0,5854		
	443 T	+	0,5402	0,4888	0,6093		
ELONGATIONSFAKTOR 1-ALPHA:							
	107 S	+	0,5151	0,4288	0,5284		
	273 S	+	0,5628	0,4621	0,5733		
	351 T	+	0,4633	0,4600	0,5704		
	418 T	+	0,5371	0,4844	0,6033		
GRP-78:							
	137 T	+	0,4878	0,4298	0,5297		
	182 T	+	0,4386	0,3927	0,4798		
	447 S	+	0,4826	0,4141	0,5086		
	641 S	+	0,3922	0,3780	0,4599		
	645 S	+	0,4017	0,3717	0,4514		
ENOLASE:							
	39 S	++	0,5682	0,4396	0,5429		
	414 S*	+	0,4436	0,3839	0,4679	919	*
FRUKTOSE-BISPHOSPHAT ALDOLASE:							
	252 T	+	0,4048	0,3782	0,4602		
	253 T	+	0,3869	0,3862	0,4710		
HEXOKINASE							
	187 T	++	0,5728	0,4487	0,5552		
	190 S	+	0,4888	0,4531	0,5612		
	313 S	+	0,4719	0,4552	0,5640		
	347 S*	+	0,4368	0,4280	0,5273	854	*



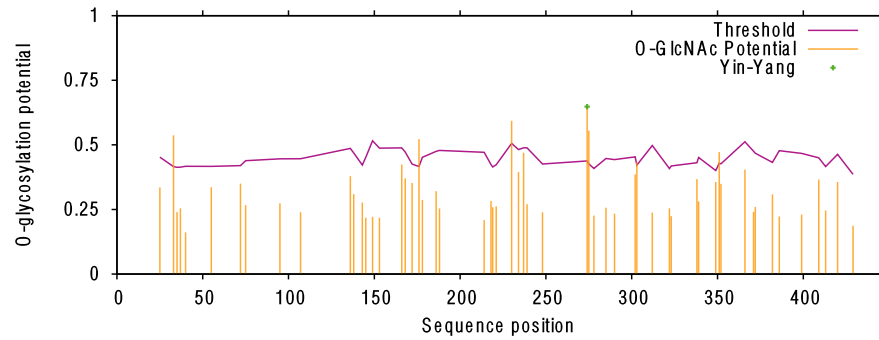
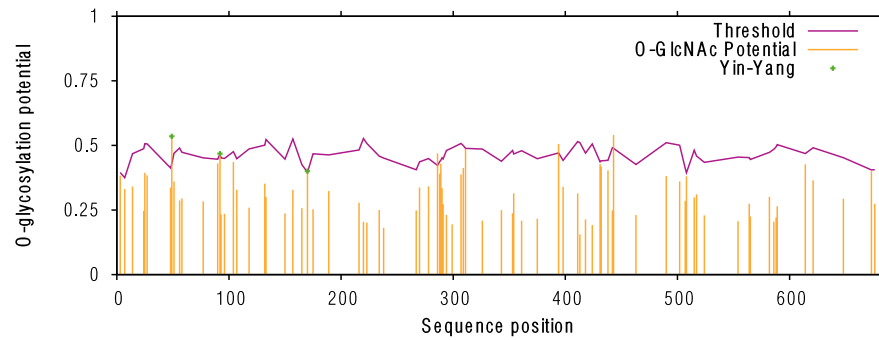
Actin 1



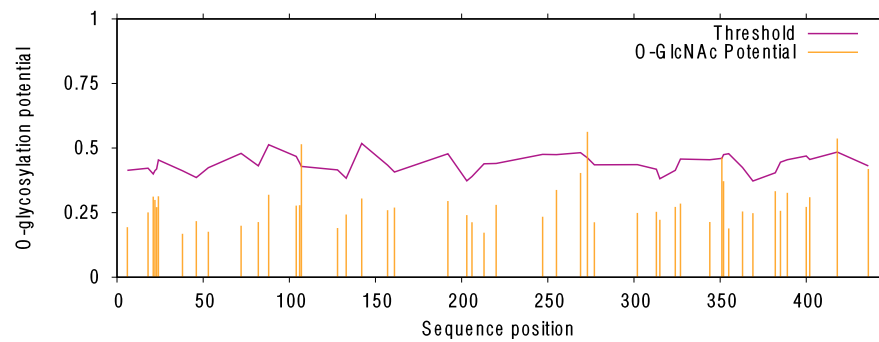
Actin 2

 α -Tubulin

(a)

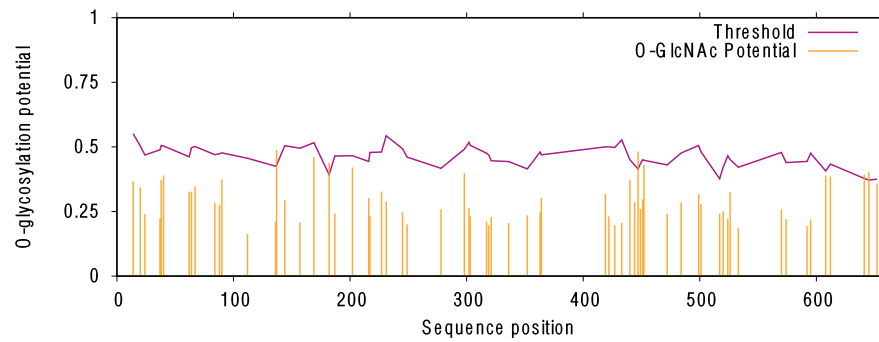
 β -Tubulin

HSP 70

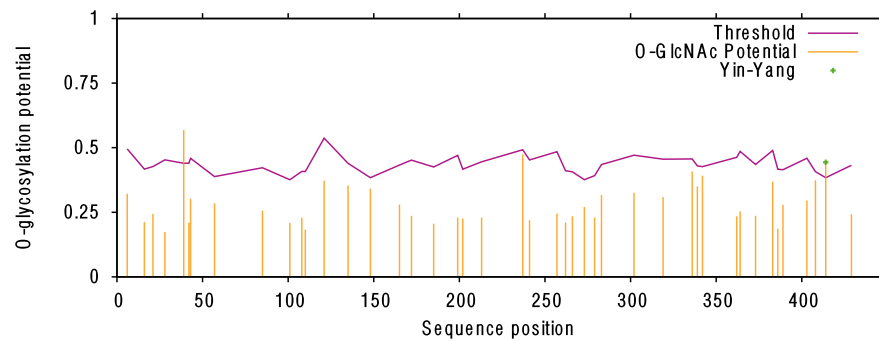


Elongationsfaktor 1-alpha

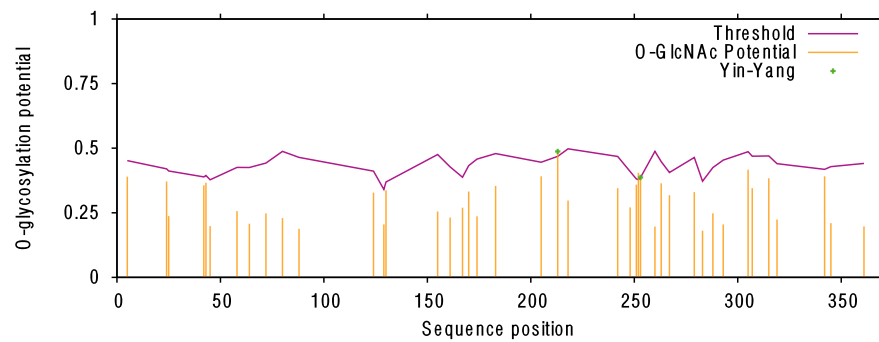
(b)



GRP-78



Enolase



Fructose-bisphosphat Aldolase

(c)

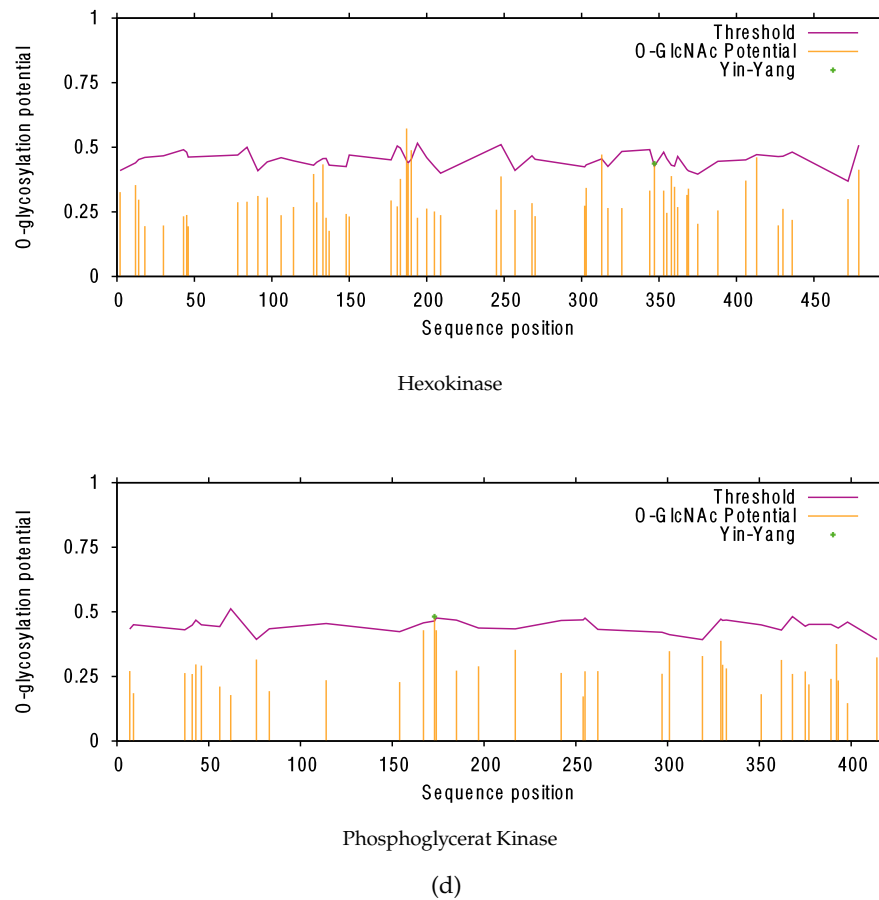


Abbildung 16: Beurteilung der O-GlcNAcylierungswahrscheinlichkeit von Serin und Threonin in der Aminosäuresequenz einzelner, als O-GlcNAc-modifiziert identifizierter, *P.falciparum* Proteine. ‚Ser‘ und ‚Thr‘ sind als vertikale Striche dargestellt. Ein Überschreiten des Grenzwertes ‚threshold‘ zeigt die Möglichkeit einer O-GlcNAc-Modifikation an. Ein grünes Plus ‚+‘ zeigt die zusätzliche Phosphorylierungsmöglichkeit der Stelle.

Plasmodium_alpha_tubulin_2	PSPQV ST AVVEPY
Plasmodium_alpha_tubulin_1	PSPQV ST AVVEPY
MN9D_alpha_tubulin_isotypes	PAPQV ST AVVEPY
	* : *****

Abbildung 17: Mögliche O-GalNAcylierungs-Stelle von α -Tubulin:

Im Vergleich zu der bei MN9D bekannten O-GlcNAcylierten Peptidsequenz weicht die entsprechende Stelle bei beiden Unterformen von α -Tubulin bei *P. falciparum* nur um eine Aminosäure ab. An das hervorgehobene ‚S‘ oder ‚T‘ wird bei MN9D Zellen O-GlcNAc gebunden. ‚:‘ markiert die abweichende Stelle bei *P. falciparum*.

Modifiziert nach [139]

5.4 BESTIMMUNG DER UDP-GLCNAC KONZENTRATION

Donor für die OGT und damit notwendiges Substrat der O-GlcNAcylierung ist der Nuklotidzucker UDP-GlcNAc, der als Endprodukt im Hexosamin-Biosyntheseweg entsteht (vgl. [Abbildung 18](#)). Dieser Stoffwechselweg reagiert sehr sensitiv auf das Ernährungsniveau und gilt als Glukose-Sensor in somatischen Zellen. Neben der O-GlcNAcylierung dient UDP-GlcNAc als Vorstufe für O-gebundenes GALNAc, der N-Glykosylierung, der Synthese von CMP-NEUNAc welches als Donor bei der Sialylierung dient sowie der Synthese von Glykolipiden und komplexer GPI-Anker. [31, 117]. Eine Recherche auf der Online-Genomdatenbank „PlasmoDB“ (<http://plasmodb.org/>) zeigte, dass alle Enzyme des Hexosamin-Biosynthesewegs im Genom von *P. falciparum* codiert sind. Sie sind dort abrufbar als:

PGI: PF3D7_1436000 glucose-6-phosphate isomerase

GFAT: PF3D7_1025100 glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase, putative

GNPNAT1: PF3D7_0629000 glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase

UAP: PF3D7_1343600 UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, putative

AGM1: PF3D7_1130000 phosphoacetylglucosamine mutase, putative

Um die Reserven zu ermitteln auf welche *P. falciparum* für die O-GlcNAcylierung zurückgreifen kann, wurde die UDP-GlcNAc-Konzentration der lysierten, reifen Trophozoiten chromatografisch bestimmt und mit humanen Fibroblasten (MRC-5 Zellen) mit bekannt hohem UDP-GlcNAc-Niveau verglichen. Zum Ausschluss einer Kontamination wurde zudem der UDP-GlcNAc-Gehalt der Erythrozyten ermittelt. Hierfür wurden die Parasiten in hypotonischer Pufferlösung gelöst und filtriert, sodass nach Auswaschen des Filters ein Endvolumen von 3 ml vorlag. Dieses wurde in zwei Anteile à 1,5 ml aufgeteilt von denen einer mit 10 nmol UDP-GlcNAc versetzt („gespikt“) wurde. Die MRC-5 Zellen wurden auf gleiche Art filtriert, jedoch mit 10 ml ausgewaschen. Ebenso die Erythrozyten, welche zuvor, wie bei der Gewinnung der Parasitenproben in Saponin gelöst wurden (vgl. [Unterabschnitt 4.1.5](#)). Zur Fertigung eines Identifizierungsstandards wurden 10 nmol/ml folgender Nukleotidzucker, Nukleotide bzw. Zucker injiziert: UMP, UDP, ADP-Glc, GlcNAc, UDP-GALNAc. Als Kalibrierungsstandard zur Konzentrationsbestimmung für UDP-GlcNAc wurde eine Verdünnungsreihe mit UDP-GlcNAc angefertigt und ebenfalls filtriert. Als Standard wurden in 1,5 ml-gelöst, folgende Stoffmengen injiziert: 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 und 10,0 nmol Die chromatografische Bestimmung erfolgte mit Hilfe der *High Performance Anion Exchange Chromatography* (HPAEC) in einer ProPAC-PA1 Säule. Die chromatografische Analyse erfolgt unter Nutzung eines stark alkalischen Eluenten. Dieser erwirkt die Umwandlung von Hydroxyl-Gruppen in Oxianions. Kohlenhydrate können somit ohne vorherige

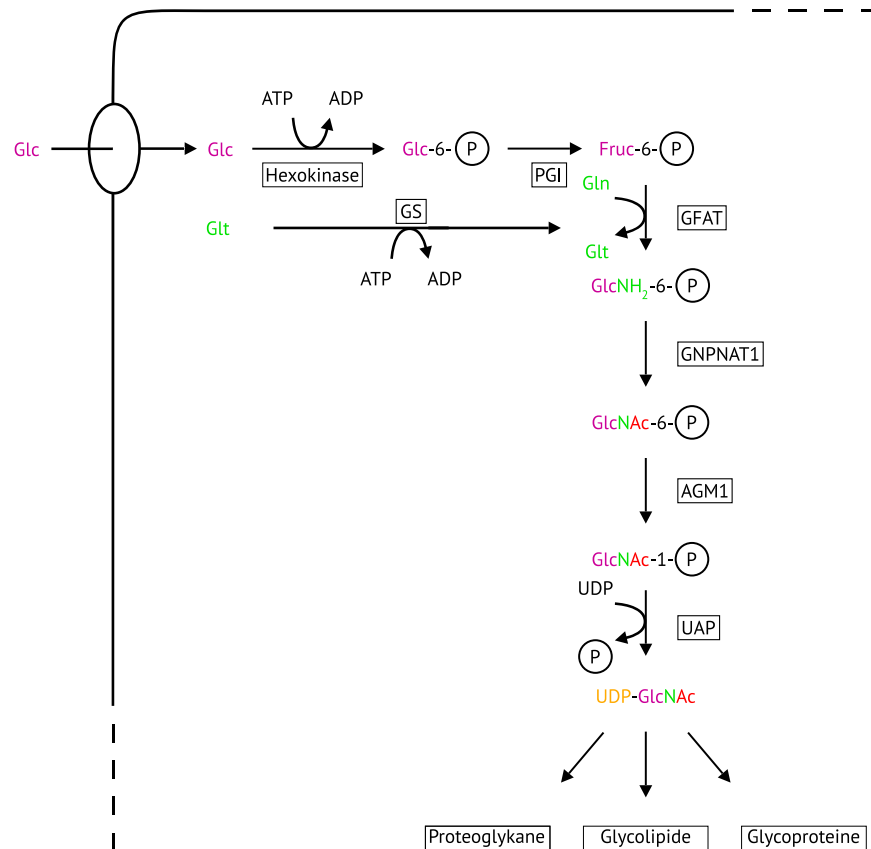


Abbildung 18: Hexosamin-Biosyntheseweg:

UDP-GlcNAc wird über den Hexosamin-Biosyntheseweg synthetisiert. 5 - 10 % der zellulär aufgenommenen Glukose wird in den Stoffwechselweg eingespeist.

GLC: Glukose; GLN: Glutamin; GLT: Glutamat; GS: Glutamat-Ammonium-Ligase; PGI: Phosphoglucose-Isomerase; GFAT: Glutamin:Fruktose-6-Phosphat Amidotransferase, GNPAT1: GlcNH₂-6-Phosphat N-acetyltransferase 1, AGM1: Phospho-GlcNAc Mutase 1, UAP: UDP-GlcNAc Pyrophosphorylase.

Modifiziert nach Schleicher *et al*, [229]

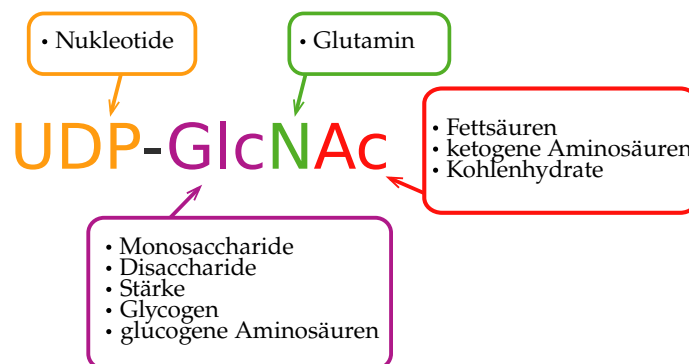


Abbildung 19: UDP-GlcNAc: Am Kreuzweg mehrerer verschiedener Stoffwechselwege.

Substrate aus den Stoffwechselwegen der Aminosäuren, der Kohlenhydrate, der Nukleotide und der Fettsäuren speisen den Hexosamin-Biosyntheseweg. Er kann somit als ein Knotenpunkt des zellulären Metabolismus angesehen werden.

Modifiziert nach Biwi *et al* [31]

Tabelle 3: Ergebnisse der chromatografischen UDP-GlcNAc Bestimmung

PROBE	KONZENTRATION [nmol/1,5 ml]	DURCHFLUSSVOL. [ml]	INTEGRAL [mAU*ml]
Standard 0,25	0,25	15,65	1,1330
Standard 0,50	0,50	15,79	1,9995
Standard 1,0	1,00	15,77	4,0388
Standard 2,0	2,00	15,76	7,7411
Standard 4,0	4,00	15,90	15,3793
Standard 10,0	10,00	15,69	38,0612
(a) Kalibrierungsstandards			
MRC-5 Zellen	8,01	15,49	30,5694
<i>P. falciparum</i>	0,72	15,71	2,7512
<i>P. falciparum</i> + UDP-GlcNAc	11,32	15,63	43,2151
(b) Proben			

Komplexbildung mit Borsäure oder organische Lösungsmittel chromatographiert werden.

Für die injizierten Nukleotidzucker- und Glucosaminstandards ergaben sich Spitzen (*peaks*) mit Maxima nach folgenden geflossenen Elutionsvolumina: UMP: 15,03 ml, ADP-Glc 15,15 ml, UDP-GalNAc 15,82 ml und UDP 19,52 ml. Für ungebundenes GlcNAc lies sich kein Peak ermitteln. UDP-GlcNAc zeigte eine maximale Auslöschung bei 15,70 ml (vgl. Tabelle 4a).

Für den Kalibrierungsstandard der UDP-GlcNAc Konzentrationen ergaben sich für die einzelnen Konzentrationen die in Tabelle 4a aufgeführten Integrale (vgl. Abbildung 20).

Die Integrale der Auslöschungsmaxima des Kalibrierungsstandards wurden in ein Diagramm gegen die jeweilige Stoffmenge eingetragen und eine lineare Regressionskurve durch den Punkt x/y (0/0) gezogen. Die Steigung dieser Kalibrierfunktion betrug $f(x) = 5,7241$ bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9999$ (vgl. Abbildung 22). Über diese Gleichung ließ sich nun, über das Integral der Auslöschung unter dem Maximum bei 15,70 ml Durchflussvolumen, der Gehalt an UDP-GlcNAc, injizierter Proben berechnen.

Um zu bestätigen, dass das gewählte Auslöschungsmaximum sicher UDP-GlcNAc repräsentierte, wurden die jeweiligen Proben (*P. falciparum* und MRC-5-Zellen) mit 10 nmol UDP-GlcNAc „gespikt“, bevor diese filtriert und injiziert wurden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Maximum an der entsprechenden

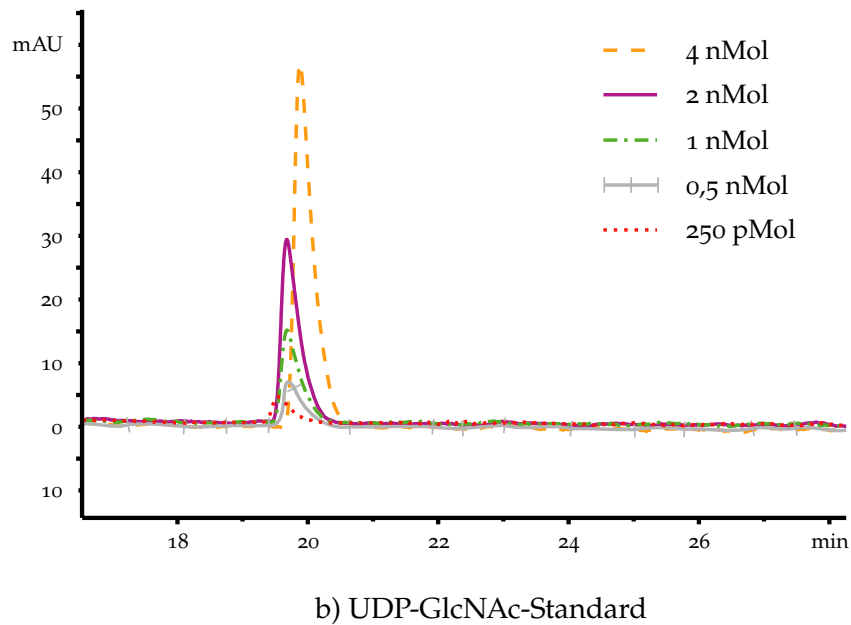
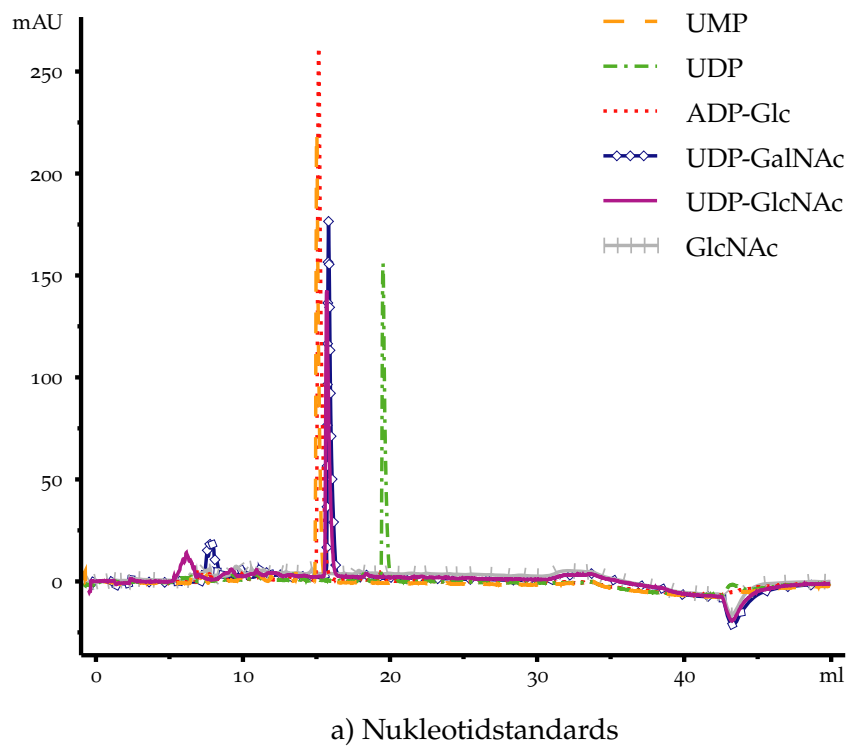


Abbildung 20: Ergebnisse der HPAEC 1:

(a) Kontrollstandard: Die Nukleotidzucker- und Glucosamine: UMP, UDP, ADP-Glc, UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc und GlcNAc, werden je in einer Dosis von 10 nMol filtriert und anschließend injiziert.

(b) Kalibrierungsstandard: UDP-GlcNAc-Lösung in absteigenden Konzentrationen (4; 2; 1; 0,5; 0,25 nmol/1,5 ml).

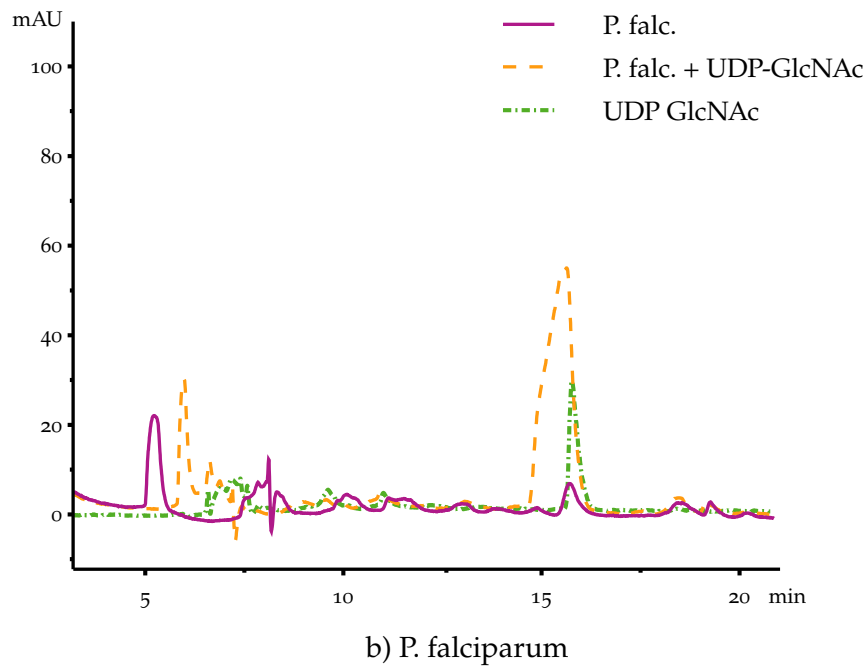
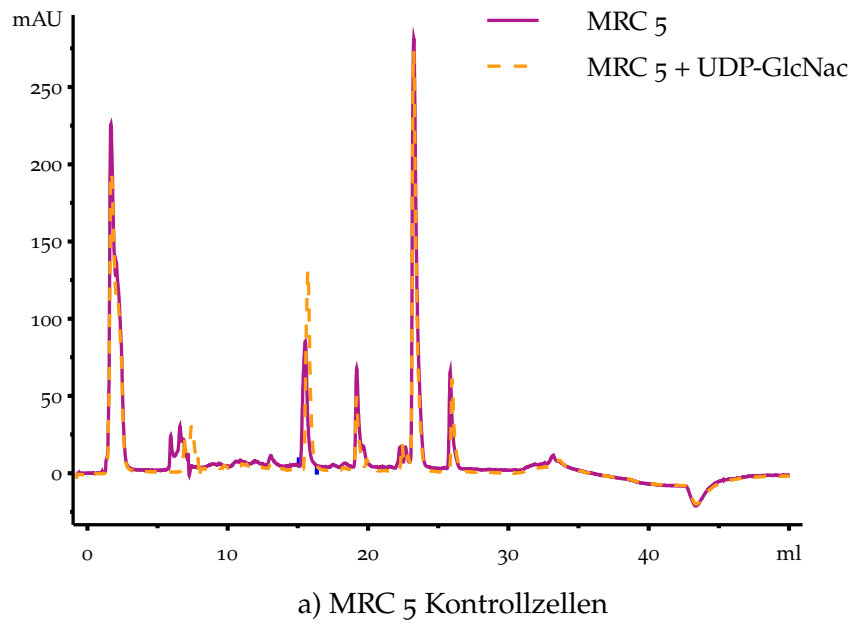


Abbildung 21: Ergebnisse der HPAEC 2:

(a) MRC-5 Zellen (Kontrolle) als alleinige Injektion und gespickt mit UDP-GlcNAc. (b) *P. falciparum* zeigt ein Maximum nach 15,7 ml. Zum Vergleich: Mit einem 10 nmol UDP-GlcNAc-Standard „gespickte“ Probe sowie 2 nmol UDP-GlcNAc-Standard mit Maximum nach gleichem Durchflussvolumen.

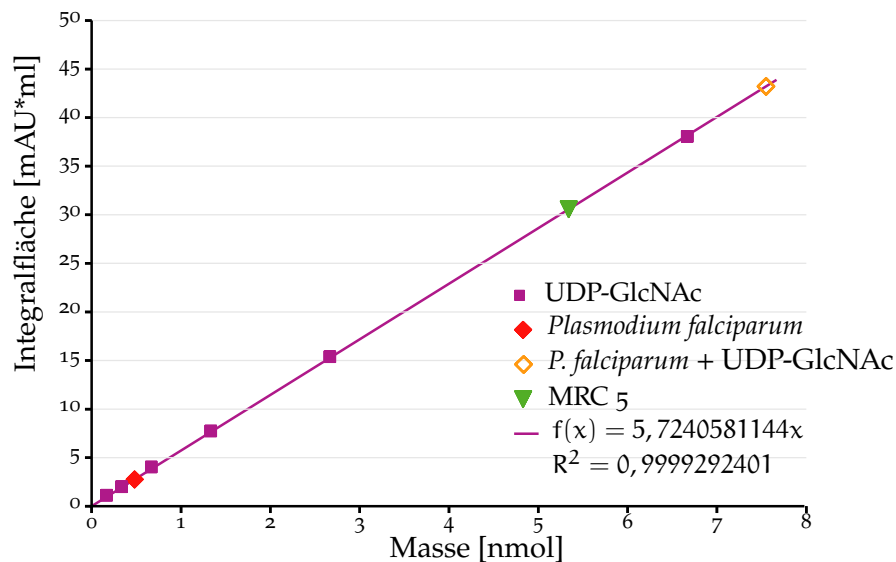


Abbildung 22: HPAEC: Kalibrierfunktion für UDP-GlcNAc

Die Funktion ist als Regressionskurve durch die Punkte der Kalibrierungsstandards gelegt. Darauf eingezeichnet sind die HPAEC Ergebnisse für *P. falciparum* (Raute), *P. falciparum* gespickt (leere Raute) und die MRC-5 Kontrolle (Dreieck).

Stelle bei unveränderter Form an Höhe zunahm (vgl. [Abbildung 21](#)).

Dies erhärtet die Annahme, dass es sich bei dem Maximum um UDP-GlcNAc handelt. Die injizierten lysierten Erythrozyten zeigten keinen Peak an der entsprechenden Stelle. Dies spricht gegen eine Kontamination mit Nukleotidzuckern aus den Wirtszellen.

Die *P. falciparum*-Probe zeigte ein Maximum nach 15,7 ml mit einem Integral von 0,48 [mAU*ml] (vgl. [Abbildung 21](#)). Dies entsprach, für die injizierten 1,5 ml, einer UDP-GlcNAc-Konzentration von 0,72 nmol/1,5ml (vgl. [Tabelle 4b](#)). Dieser Wert wurde mit zuvor photometrisch bestimmten Proteinkonzentration der Probe verrechnet. Der so ermittelte UDP-GlcNAc-Gehalt der *P. falciparum*-Probe lag bei 18,84 nmol/mg. Für die MRC-5-Zellen ergab sich eine beträchtlich höherer Gehalt von 162,58 nmol/mg (vgl. [Tabelle 4](#)).

Tabelle 4: HPAEC: UDP-GlcNAc-Gehalt *P. falciparum* vs. MRC-5

	PROTEINK. [mg/ml]	VERDÜNNUNG	STOFFMENGE [nmol]	UDP-GLCNAC [nmol/mg]
<i>P. falcip.</i>	0,08	1/3	0,48	18,84
MRC-5	0,33	1/10	5,34	162,58

Im Vergleich zu MRC-5 liegt ist die Konzentration von UDP-GlcNAc im Verhältnis zur Proteinmasse bei *P. falciparum* um mehr als achtfach geringer.

5.5 AUSWIRKUNG DER O-GLCNACASE-INHIBITION AUF DAS WACHSTUM

Thiamet-G ist ein hochpotenter selektiver Inhibitor der OGA. Das Molekül imitiert ein Intermediat der Hydrolyse und inhibiert diese dadurch [309]. Hierfür wurde eine *P. falciparum*-Kultur aufgeteilt und der Inhibitor in der Konzentration von 10, 30, 100, und 200 μM hinzugegeben. Einen Teil der Kultur wurde als Kontrolle ohne Inhibitor belassen. Alle 24 Stunden wurden Ausstriche angefertigt, von welchen zur Bestimmung der Parasitämie foto-mikroskopisch Bilder angefertigt wurden, die im Anschluss manuell ausgezählt wurden. Im Verlauf mussten die Kulturen geteilt werden, um eine zu hohe Parasitämie (über 12–15 %) und damit das Absterben der Kultur bzw. die Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit zu verhindern. In zwei Versuchsreihen ergaben sich die in [Tabelle 5](#) angegebene Werte.

Tabelle 5: Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit durch Thiamet-G

KONZENTRATION [μM]	PARASITÄMIE					
	24h	48h	72h	96h	120h	144h
ERSTE VERSUCHSREIHE						
0	6,17 %	1,03 %	0,88 %	0,97 %	2,40 %	4,49 %
10	4,23 %	0,78 %	0,44 %	3,06 %	1,52 %	2,45 %
30	4,79 %	1,22 %		1,91 %	3,06 %	2,22 %
100	5,14 %	0,71 %		1,17 %	1,96 %	2,88 %
200	4,29 %	0,88 %	1,12 %	0,57 %	2,04 %	4,30 %
ZWEITE VERSUCHSREIHE						
0	3,75 %	5,12 %	3,99 %	2,92 %	3,31 %	
10	2,00 %	3,78 %	2,80 %	3,17 %	2,69 %	
30	2,17 %	5,68 %	2,73 %	2,65 %	2,56 %	
100	2,33 %	4,71 %	3,01 %	2,96 %	2,56 %	
200	2,17 %	3,81 %	3,95 %	3,50 %	2,80 %	

In beiden Versuchsreihen ist ein Rückgang der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Kontrollkulturen beobachten. Zu den jeweiligen Endpunkten zeigte sich ein Differenz der Parasitämie von max. 50,56 % (bzw. 22,65 % in Versuch 2) und minimal 4,33 % (bzw. 15,40 %). Das zwischenzeitige, gleichmäßige Absinken der Parasitämien (in Versuchsreihe 1 bei 48 h Versuchsreihe 2 bei 72 h und 120 h) ist Folge des Splittierens der Proben. Aufgrund der relativ geringen Probenzahl, sowie der mit dem manuellen Auszählen der Parasitämie verbundenen Ungenauigkeit, kam es zu einer relativ hohen Streuung der Mittelwerte. Ein *t*-Test wurde durchgeführt und die Daten als Boxplot dargestellt [Abbildung 23](#). Angesichts der oben genannten Gründe ist es nicht verwunderlich, dass kein signifikantes Ergebnis

erreicht werden konnte. Der Trend zeigt jedoch eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit durch die Hemmung der Hydrolyse von O-GlcNAc.

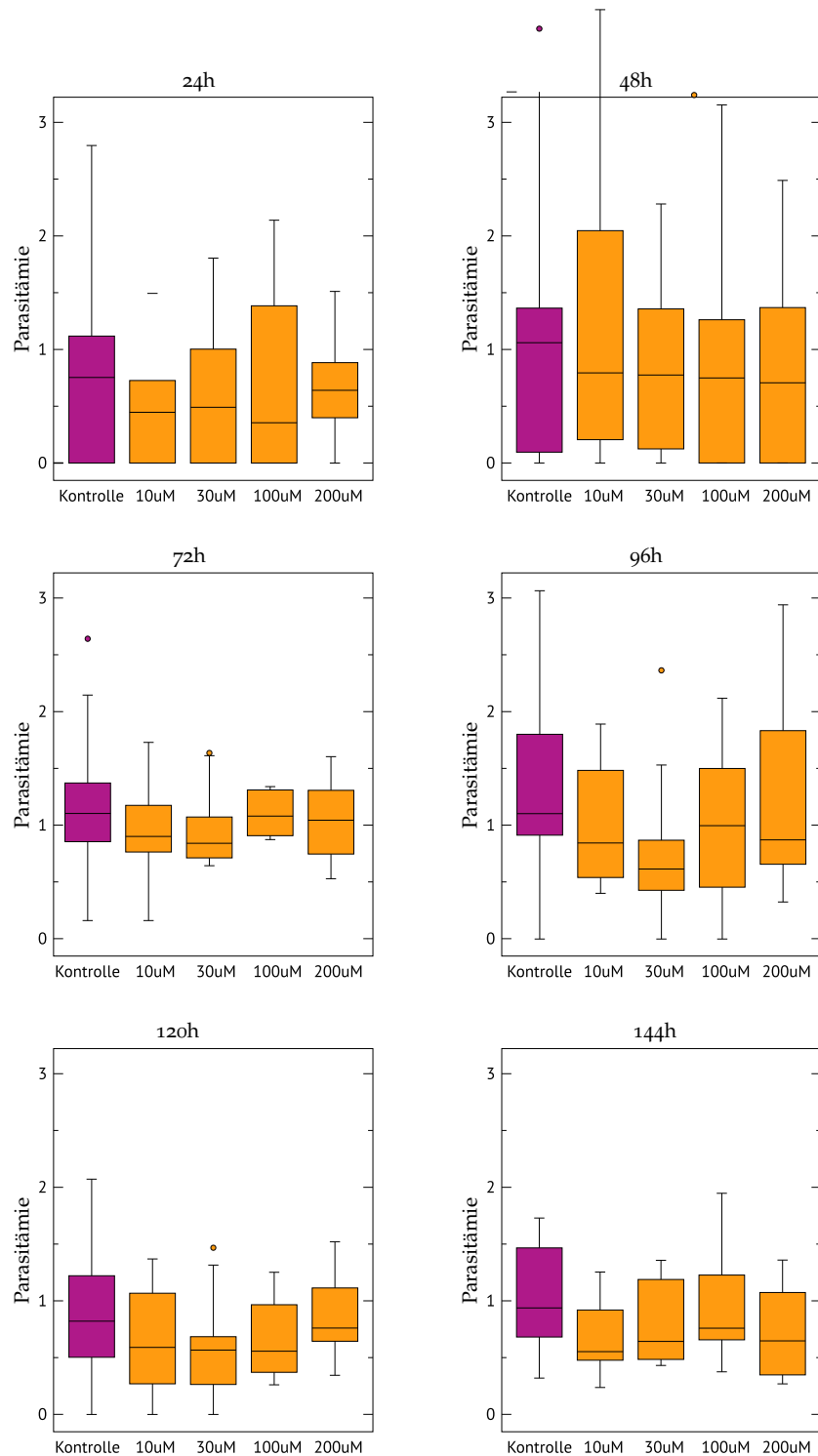


Abbildung 23: Thiamet-G hemmt das Wachstum von *P. falciparum* in vitro

DISKUSSION

6.1 DIE IDENTIFIZIERTEN O-GLCNACYLIERTEN PROTEINE

Das Vorkommen der O-GlcNAc-Modifikation bei *P. falciparum* war bereits 1993 von A. Dieckman-Schuppert *et al*, durch Übertragung radiomarkierter Galaktose auf GlcNAc-Reste parasitärer Proteine, nahegelegt worden [65]. Man beachte, dass die Nachweisteknik die gleiche ist, welche zur Ursprünglichen Entdeckung der Modifikation geführt hatte. Es bestand daher ein recht spezifischer Nachweis, der jedoch noch keine Auskunft über die Natur der markierten Proteine zuließ, welche letztendlich O-GlcNAcyliert waren. Die Beobachtung wurde von Y. Perez Cervera durch den Nachweis von O-GlcNAcylierten Proteinen bei *P. falciparum* und den, ebenfalls dem Phylum der Apikomplexae angehörigen *T. gondii*, über die Markierung mit dann verfügbaren O-GlcNAc spezifischen Antikörpern im Western Blot bestätigt [201]. In der hier vorliegenden Arbeit gelang, neben der Erhärtung dieser Resultate durch weitere Methoden der O-GlcNAc-Darstellung, nun erstmals die Identifizierung individueller O-GlcNAcylierter Anteile des Proteoms von *P. falciparum* in der Massenspektroskopie. Bei parallel hierzu in Zusammenarbeit mit Moyira Aquino Gil durchgeführten Untersuchungen, konnten wir bei *T. gondii* ebenfalls individuelle, O-GlcNAc-modifizierter Proteine identifizieren. Diese Ergebnisse sind in der dieser Dissertation nicht näher dargelegt, jedoch 2018 gemeinsam publiziert worden [11]. Hier gelang der Nachweis von 123 verschiedenen Proteinen mit *click chemistry*=Anreicherung, 234 durch Anreicherung mit sWGA und 50 durch beide genannte Methoden.

Durch Anwendung verschiedener proteomischer Herangehensweisen, konnten wir bei *P. falciparum* 14 verschiedene O-GlcNAcylierte Proteine identifizieren. Eine im Vergleich zu anderen Zelllinien große Herausforderung bei der proteomischen Untersuchung von Apikomplexae und anderen Parasiten, ist der hohe züchterische Aufwand, um ausreichend Material für die Untersuchung herzustellen. Man beachte, dass zum Beispiel die als Kontrolle genutzten MRC-5-Zellen als ganzes lysiert werden können und im Gegensatz zu den Parasiten zuvor nicht aus den Wirtszellen extrahiert werden müssen. Vor allem im sogenannten Ringstadium sind die Parasiten im Vergleich zu Ihren Wirtszellen, sowie dem benötigten Anzuchtmedium so klein, dass eine große Menge Material zur Bereitstellung ausreichender Proteinmengen von Nöten ist, was neben dem damit verbundenen Material- und Arbeitsaufwand, auch mit einer erhöhten Gefahr der Kontamination durch Bakterien und Hefen verbunden ist. Zur Einordnung der Menge an benötigtem Material: Die

für unsere Versuche verwendeten Präzipitate im Trophozitenstadium entstammten aus zwischen $1,1 - 1,6 \times 10^9$ infizierten Erythrozyten. Hier lagen die O-GlcNAc-Konzentrationen der Proteinextrakte bereits im unteren Nachweisbereich. Die Präzipitate im Ringstadium stammten aus bis zu $2,4 \times 10^{10}$ infizierten Zellen und maßen dabei im makroskopischen Vergleich der Proben nur ca. ein Viertel des Pelettolumens. Daher wurde die proteomische Identifizierung in der Massenspektroskopie in dieser Arbeit auf Parasiten im größeren Trophozitenstadium beschränkt. Hier füllen die Parasiten einen Erythrozyten aus, messen also ca. $7 \mu\text{m}$. Eine zukünftige Untersuchung des O-GlcNAcylierten Proteoms von *P. falciparum* im Ringstadium würde jedoch sicherlich weitere interessante Informationen zu Tage fördern. Im Vergleich der, durch *click chemistry* markierten, O-GlcNAc-modifizierten Proteine konnte jedoch bereits ein Unterschied in der O-GlcNAcylierung beider Stadien gezeigt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die O-GlcNAcylierung von Bedeutung für die Stadien-Entwicklung sein könnte. Es ist bereits bekannt, dass O-GlcNAc eine wichtige Rolle im Ablauf von Zellzyklen verschiedener bakterieller und eukaryotischer Arten, wie beispielsweise den oozytären Stadien von *Xenopus laevis*, zukommt [161, 165, 258]).

Eine weitere Herausforderung bei der Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine war die Tatsache, dass das Ausmaß der O-GlcNAcylierung bei *P. falciparum* offensichtlich vergleichsweise niedrig ist, was die im Vergleich zu *T. gondii* geringere Anzahl der in der Massenspektroskopie identifizierten Proteine erklärt.

6.1.1 Proteine der Glykolyse

Vier der identifizierten Proteine sind an der Glykolyse beteiligt, wobei die Hexokinase nicht spezifisch für diesen Stoffwechselweg ist. Da *P. falciparum* über keinen vollständigen Citratzyklus verfügt, ist der Parasit von der Glykolyse, als einziger Möglichkeit der ATP-Produktion, abhängig [218]. Beachtlich äußert sich dies in der Beobachtung, dass mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten eine im Vergleich zu uRBC bis zu 100-fach erhöhte Glykolyserate zeigen [219]. Um dies zu erreichen scheint der Parasit unter anderem die Möglichkeit zu haben, den Glukoseverbrauch umliegender uRBC zu drosseln [181].

Aufgrund der Bedeutung für das Überleben des Parasiten, sind drei der identifizierten, an der Glykolyse beteiligten Proteine, bereits in den Fokus der Forschung möglicher Malariamedikamente gerückt:

Die Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase ist das vierte Enzym des Glykolyse-Stoffwechselwegs. Sie katalysiert die Spaltung von Fructose 1,6-Bisphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP). Alternativ kann Fructose-1-Phosphat als Substrat dienen [125]. Im Gegensatz zum Menschen und anderen Säugern verfügt *P. falciparum* lediglich über eine Isoform der Aldolase, die nur zu etwas mehr als 50 % identisch zu den drei humanen Iso-

formen ist [148]. Dies macht das Enzym zu einem vielversprechenden Ziel. Neben ihrer Rolle in der Glykolyse kann die Aldolase an Actin binden und dieses mit dem TRAP verbinden. Dieses, bei verschiedenen Apicomplexae vorkommende, transmembrane Adhesin ist am Invasionsprozess des Parasiten beteiligt. Es bindet hierbei an die erythrozytäre Membran [33]. Auch wenn sich TRAP bei *T. gondii* als nicht essentiell für den Invasionsvorgang selbst herausgestellt hat [234], wurde diskutiert ob die Inhibierung des Aldolase-TRAP-Komplexes die Invasion aufgrund dessen Notwendigkeit für den *gliding*-Prozess inhibieren könnte [189]. Bei *Xenopus laevis*-Oocyten konnte bereits eine O-GlcNAcylierung der Aldolase gezeigt werden [59].

Enolase, das neunte Enzym der Glykolyse, katalysiert die reversible Dehydratation von 2-Phosphoglycerat zu Phosphopyruvat [28]. Die Enzymaktivität von Enolase ist in iRBC stark erhöht [220]. Dies erklärt sich aus *P. falciparum*s hohem Bedarf an Glukose. Neben der Glykolyse nimmt Enolase verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Kompartimenten der parasitären Zelle ein. So konnte die Präsenz des Enzyms im Zellkern, den Speisevakuolen und im Merozoiten-Stadium auf der Membranoberfläche nachgewiesen werden [197]. Im ookinetischen Stadium kann das Protein einen Rezeptor des Anopheles-Mitteldarmepithels erkennen und das dortige Plasminogen zur Protein- und Kohlehydrat-Verdauung nutzen [97]. Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmodien-Enolase unter thermo-oxidativem Stress einen Komplex mit Hsp70 und weiteren Proteinen eingeht [232]. Es wird angenommen, dass an Enolase bindendes Billiverdin die Ausreifung von Ring- zu späteren Stadien aufhält [7]. Die Inhibition der Enolase über Antikörper gegen ein *P. falciparum*-spezifisches Epitop des Proteins konnte das Parasitenwachstum im Blutstadium hemmen [74]. Die O-GlcNAcylierung des Enzyms konnte bereits in Rattenhirn, sowie Alzheimer und Brustkrebs-Zellen nachgewiesen werden [64, 208, 289].

Die Enzyme aus der Gruppe der Hexokinasen katalysieren nicht nur den ersten Schritt der Glykolyse, sondern auch der Hexosamin-Biosynthese (vgl. [Abbildung 18](#)). Sie phosphorylieren Glukose zu Glukose-6-Phosphat [28]. Hexokinasen werden über die negative Rückkopplung ihres Produktes gehemmt und gelten als Schrittmacher der Glykolyse. Bei *P. falciparum* ist die Geschwindigkeit der Einschleusung der Kohlenhydrate in die Zelle jedoch anscheinend der limitierende Faktor der Glykolyse. Das Enzym ist vornehmlich im Cytosol der Parasiten lokalisiert. Eine Überexpression der parasitären Hexokinase verringert die Empfindlichkeit von *P. falciparum* gegenüber medikamentöser Glykolyse-Inhibition deutlich [265]. Baldini *et al.* konnten an Mäusen zeigen, dass eine vermehrte O-GlcNAcylierung sowohl die Expression der Hexokinase Glucokinase (GCK) erhöht als auch post-translational deren Aktivität [20]. Hiermit ist bei anderen Spezies bereits eine

direkte Beeinflussung dieses für *P.falciparum* kritischen Stoffwechselweg durch O-GlcNAcylierung bekannt.

6.1.2 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine sind Chaperone. Die Hauptfunktion dieser Proteinfamilie ist es, das korrekte Falten von Proteinen und Zusammenfügen von Oligomeren zu gewährleisten. Hitzeschockproteine binden an Proteine und erhalten ihre Lösbarkeit im Cytosol bei zu hohen Temperaturen [77]. HSP70 ist zudem an verschiedenen Prozessen, wie der Protein-Entfaltung und Translokation, der Degradation von Proteinen, sowie der Übertragung von proinflammatorischen Signalen beteiligt [14, 27, 90]. *P. falciparum* hat sechs HSP70 Isoformen die im Cytosol, im ER im Zellkern und in den Mitochondrien lokalisiert sind [237]. Die HSP-1 Form ist überwiegend im Cytosol lokalisiert und wird bei Hitzestress in den Zellkern geschleust. Es ist bei *P. falciparum*, im Vergleich zu anderen Organismen, auffällig stark phosphoryliert. Die Phosphorylierung nimmt im Laufe der Entwicklung des Parasiten zu [142]. Da O-GlcNAc mit Phosphat um Bindungsstellen konkurrieren kann, könnte es theoretisch möglich sein, durch Induktion der O-GlcNAcylierung, die Phosphorylierung zu unterbinden, oder zu regulieren. In der Analyse der möglichen O-GlcNAc-modifizierbaren Stellen mit Hilfe des YinOYang-Servers [109] ergaben sich drei Stellen mit der Fähigkeit beide PTMs zu binden (vgl. [Abbildung 18.b](#)). HSP-1 wirkt außerdem bei *P. falciparum* als ATPASE [180]. Es wird angenommen, dass es an der Regulierung der Aktin-Polymerisierung im Rahmen der Erythrozyten-Invasion beteiligt ist [260]. Es konnte gezeigt werden, dass HSP-1 zusammen mit PfHSP90 einen Komplex bildet, der kritisch für die normale Entwicklung des Parasiten ist [21]. Die O-GlcNAc-Modifikation von HSP70 ist bei humanen Zellen nachgewiesen [105, 275, 312]. Hier konnte gezeigt werden, dass einerseits das O-GlcNAcylierungsniveau in der Zelle die Expression von HSP70 beeinflusst, andererseits das Protein selbst an O-GlcNAc binden kann [100, 162]. Aufgrund dieser Tatsache und der ähnlichen Rolle des Proteins und der PTM bei der Zellkern-Translokation von Proteinen wurde ein Zusammenhang beider diskutiert [107].

6.1.3 Proteine des Zytoskeletts

Als Bestandteil des Zytoskeletts, sind Microtubuli an verschiedenen, unentbehrlichen Prozessen der Zelle beteiligt. Sie bestimmen die Zellform, dienen als Netzwerk für den intrazellulären Transport von Proteinen und Vesikeln und spielen, als für die Teilung der Chromosomen zuständiger Spindelapparat, eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung. Microtubuli bestehen aus Dimeren von α - und β -Tubulin, zweier kugelförmiger Proteine. Diese werden unter GTP Verbrauch zu Protofi-

lamenten oligomerisiert, welche dann zu Microtubuli zusammengesetzt werden können [125]. Im Gegensatz zu mehreren hundert beim Menschen verfügt *P. falciparum* lediglich über zwei α - und eine β -Tubulin-Isoformen [139]. Aufgrund ihrer essentiellen Rolle in der Entwicklung des Parasiten, werden Tubuline intensiv als mögliches Ziel einer Malariatherapie diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Microtubuli-Polymerisation zur Unterbrechung der myotischen Teilung von Schizonten, einer reduzierten Invasion von Erythrozyten, der Unterbrechung der Bildung von geschlechtsreifen Gametozyten, sowie einer Blockierung von Parasiten im Leberstadium führt [26, 61, 81, 202]. Obwohl Präparate, die Microtubuli als Ziel haben, in der antineoplastischen Chemotherapie schon lange Anwendung finden, ist es nicht möglich diese Medikamente gegen *P. falciparum* einzusetzen. Die geringe Empfindlichkeit des Parasiten gegenüber den klassischen Microtubuliinhibitoren führt dazu, dass eine derart hohe therapeutische Dosis benötigt wird, dass die für humane Zellen toxische Schwelle weit überschritten würde [26]. Ji *et al* zeigten 2011, dass die vermehrte O-GlcNacylierung von α -Tubulin in MN9D Zellen die Bildung von Microtubuli hemmt [139]. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass α -Tubulin auch bei *P. falciparum* O-GlcNAc-modifizierbar ist und eine der dafür in Frage kommende Peptidsequenzen um lediglich eine Aminosäure von einer bei MN9D nachweislich O-GlcNAcylierbaren Stelle, abweicht. Eventuell könnte eine medikamentöse O-GlcNAcylierung des Proteins oder die Hemmung der O-GlcNAc-Abspaltung bei *P. falciparum* die Polymerisation von Tubulin und damit wichtige Mikrotubuli-abhängige Prozesse des Parasiten hemmen. Somit käme diese Technik als potentielle Malariamedikation in Frage.

Actin ist ebenfalls bereits als O-GlcNAcyliertes Protein bei anderen Organismen bekannt [59, 124]. Auch gelang der Nachweis bei den parallel an *T. gondii* durchgeführten Untersuchungen [11]. Bei diesem verwandten Protozoon ist die entscheidende Rolle des für viele Stabilisierungs- und Fortbewegungsprozesse in der Zelle verantwortlichen Proteins bei der Invasion der Wirtszellen schon lange bekannt [68]. Auch bei *P. falciparum* scheint ein Actin Isomer hier eine Schlüsselrolle einzunehmen [195]. Auch wenn noch nicht viel über die Bedeutung der O-GlcNAcylierung bei Actin bekannt ist – ob es die Polymerisierung des Proteins eher fördert oder hemmt – könnte es doch ein Ziel für die Hemmung der Parasitenausbreitung darstellen.

6.1.4 Weitere potentielle Ziele von O-GlcNAcylierung

In der Liste der identifizierten Proteine fehlen einige weitere für die O-GlcNAc-Modifikation „typische“ Proteine. Vor allem der fehlende Nachweis von in anderen Systemen bekannten Proteinen des Zellkerns in der Massenspektroskopie erstaunt. Hierfür könnte zum einen der generell niedrige O-GlcNAcylierungsgrad des Parasitenproteoms verantwortlich sein. Andererseits können auch technische Einschrän-

kungen der Nachweisempfindlichkeit eine Identifizierung verhindert haben. Auch der parallel bei *T. gondii* erfolgte Nachweis der O-GlcNAcylierung vieler Bestandteile der Rhoptrien [11] gelang bei *P. falciparum* nicht. Diese Enzyme sind sowohl für die Nährstoffversorgung als auch für die Invasion der Erythrozyten notwendig [235]. Weitere Forschung zur O-GlcNAcylierung dieser Proteine bei *P. falciparum* bietet sich daher an.

6.2 DIE BEDEUTUNG VON UDP-GLCNAC FÜR DEN PARASITEN

Der Nachweis von UDP-GlcNAc, wenn auch in relativ geringen Konzentrationen, zeigt, dass *P. falciparum* über den Donor der O-GlcNAcylierung selbst verfügt. Dies ist nicht verwunderlich, da der Parasit GPI synthetisiert. UDP-GlcNAc wird als Donor des Glucosaminanteils dieser teilweise recht komplizierten Strukturen gebraucht [96]. Zudem zeigte eine Datenbankrecherche, dass der Parasit alle für den Hexosamin-Biosyntheseweg benötigten Enzyme codiert, wenn auch manche der in der Datenbank eingetragenen Proteine diese Rolle nur mutmaßlich einnehmen. Dem in verschiedenen Systemen als Nährstoff-Sensor wirkenden UDP-GlcNAc [311], könnte bei *P. falciparum* eine ähnliche Rolle zukommen. Der Parasit kann, trotz Ermangelung eines Stoffwechselweges für die Nährstoff-Wahrnehmung Nährstoff-Fluktuationen der Wirtszellen wahrnehmen. Dies geschieht durch die Kinase KIN, welche in Reaktion auf Nährstoff-Einschränkungen das Transcriptom des Parasiten reguliert. Nährstoff-Restriktion verringert die Parasitämie, während Glukose-Substitution den Effekt umkehrt [176]. Die Biosynthese von UDP-GlcNAc benötigt Substrate aus dem Glukose-, dem Aminosäuren-, dem Fettsäuren- und dem Nukleotidmetabolismus [119]. Es werden somit die Stoffwechselwege aller wichtigen Energieträger für die Herstellung des Nukleotidzuckers benötigt. Ein Absinken von Nährstoffen aller Art schlägt sich somit in reduzierten UDP-GlcNAc-Konzentrationen nieder. Die Zelluläre Reaktion erfolgt daraufhin häufig über O-GlcNAcylierung von Kinasen [121]. Demnach wäre eine Beteiligung des Stoffwechselweges an der nährstoffvermittelten Regulierung des Wachstums im Blutstadium von *P. falciparum* gut denkbar.

6.3 PHYLOGENETISCHE ERKENNTNISSE

In Bezug auf die Phylogenetik von O-GlcNAc lässt sich aufgrund unserer Ergebnisse zeigen, dass die Modifikation evolutionär sehr früh einzuordnen ist. In unseren parallel bei *T. gondii* durchgeführten Versuchen zeigte sich auch eine Modifikation der Proteine des Apicoplasten, also des endosymbiontisch aufgenommenen Rotalgenanteils des Proteoms. Beachtlich ist diesbezüglich, dass in den von Moyira Aquino Gil durchgeführten Untersuchungen bei Pflanzen keine O-GlcNAcylierung nachzuweisen war, wenngleich diese mit SEC ein der humanen O-GlcNAc Transferase

in Struktur entsprechendes Enzym besitzen [10]. Zieht man unsere Ergebnisse bei Apicomplexae in Betracht, so muss davon ausgegangen werden, dass die Vorläuferzellen der Pflanzen zur O-GlcNAcylierung von Proteinen befähigt gewesen sein müssen. Es stellt sich somit die Frage, ob Pflanzen diese Fähigkeit eingebüßt haben, oder ob die Modifikation wie bei *P. falciparum* in sehr geringen Mengen und in diesem Fall sogar unter der Nachweisgrenze vorliegt.

6.4 O-GLCNACYLIERUNG ALS MÖGLICHER NEUER ANSATZPUNKT FÜR EINE THERAPIE

Auch nach Identifizierung von 14 O-GlcNAcylierten Proteinen bei *P. falciparum*, die an verschiedenen, für den Parasiten teils überlebensnotwendigen, metabolischen Systemen mitwirken, bleibt die Funktion der PTM in diesen Systemen weiterhin im Unklaren. Es gilt im einzelnen noch herauszufinden, ob O-GlcNAc essentiell für die vollständige Funktionalität dieser Systeme ist, oder diese im Gegenteil durch eine zu starke O-GlcNAcylierung gehemmt werden. Bei Erkrankungen bei Menschen wird der PTM ebenfalls in einigen Systemen protektive, in anderen pathologische Eigenschaften zugesprochen. Lediglich bei einigen Proteinen wie α -Tubulin können wir, über den Vergleich zu anderen Organismen, Schlüsse über die Auswirkung der Modifikation schließen. Um die Möglichkeit von O-GlcNAc als Ziel in der Malaria-therapie bewerten zu können, bedarf es weiterer Forschung in diese Richtung. Auch muss ermittelt werden welche Enzyme die Übertragung und Katalyse des Aminozuckers, in Ermangelung einer zu anderen Organismen isoformen OGT und OGA bei *P. falciparum* übernehmen. Mit dem Einsatz eines OGA-Hemmstoffes wurde in dieser Dissertation bereits ein möglicher therapeutischer Ansatz evaluiert.

6.4.1 O-GlcNAcylierung und Parasitenentwicklung

Mit Tubulin als Protein des Spindelapparats und den Enzymen der Glykolyse als wichtigste Energieproduzenten des Parasiten verfügt *P. falciparum* über mehrere O-GlcNAc-modifizierbare Proteine, die für die Entwicklung der Parasiten im Blutstadium essentiell sind. Zudem konnte ein unterschiedliches O-GlcNAcylierungsmuster der Ring- und Trophozoitenstadien nachgewiesen werden (Abbildung 9). Vor allem im Bereich unter 100 kDa zeigten sich größere Abweichungen. Diese Varianz könne von einer unterschiedlich starken Expression der OGT oder OGA bzw. der Zielproteine herrühren. Ebenfalls möglich wären Unterschiede in der UDP-GlcNAc-Konzentration zwischen den Stadien. Generell wäre das abweichende O-GLcNAcylierungsmuster gut mit einem Einfluss der PTM auf die Entwicklung des Parasiten vereinbar.

6.4.2 Hemmung der OGA

Die Inkubation von *P. falciparum* mit verschiedenen Konzentrationen des OGA-Inhibitors Thiamet-G zeigten eine leichte Abnahme des Parasitenwachstums. Das Ergebnis war nicht signifikant, auch zeigte sich keine Korrelation zwischen Inhibitorkonzentration und Wachstumshemmung. Auch kann aufgrund mangelndem Wissens über die Struktur der parasitären OGA nicht einmal mit Sicherheit angenommen werden, dass der Inhibitor überhaupt in der Lage ist das Enzym zu hemmen.

6.4.3 Wie funktioniert die O-GlcNAcylierung bei *P. falciparum*

Angesichts der Tatsache, dass die OGT und OGA bei *P. falciparum* bisher weder durch immunologische Methoden noch durch Sequenz-*alignment* nachgewiesen konnten ([201]), verbleiben zwei Möglichkeiten wie O-GlcNAc auf die parasitären Proteine übertragen wird. Entweder der Parasit verfügt über Enzyme, die sich in ihrer Struktur von denen der Pflanzen und Tiere unterscheiden oder der Parasit importiert Wirtsproteine, um die O-GlcNAcylierung durchzuführen. Es ist bekannt, dass *P. falciparum* erythrozytäre Enzyme einschleusen kann [32, 151]. Dennoch erscheint der Transport dieser relativ großen Proteine über die Membranen des Parasiten unwahrscheinlich. Auch ist nicht anzunehmen, dass Erythrozyten – wenn auch ein Teil ihrer Proteine O-GlcNAcyliert sind – über eine aktive OGA verfügen. Daher scheint die erste Annahme wahrscheinlicher. Eine sich strukturell von anderen Organismen stark divergente OGA, böte sich als Zielstruktur einer neuartigen Malariatherapie an. Als alternatives Ziel käme, in Ermangelung weiterer Informationen zur Beschaffenheit der parasitären OGT, der parasitäre Hexosamin-Biosyntheseweg, als eine für die O-GlcNAcylierung unerlässlichen Struktur in Frage.

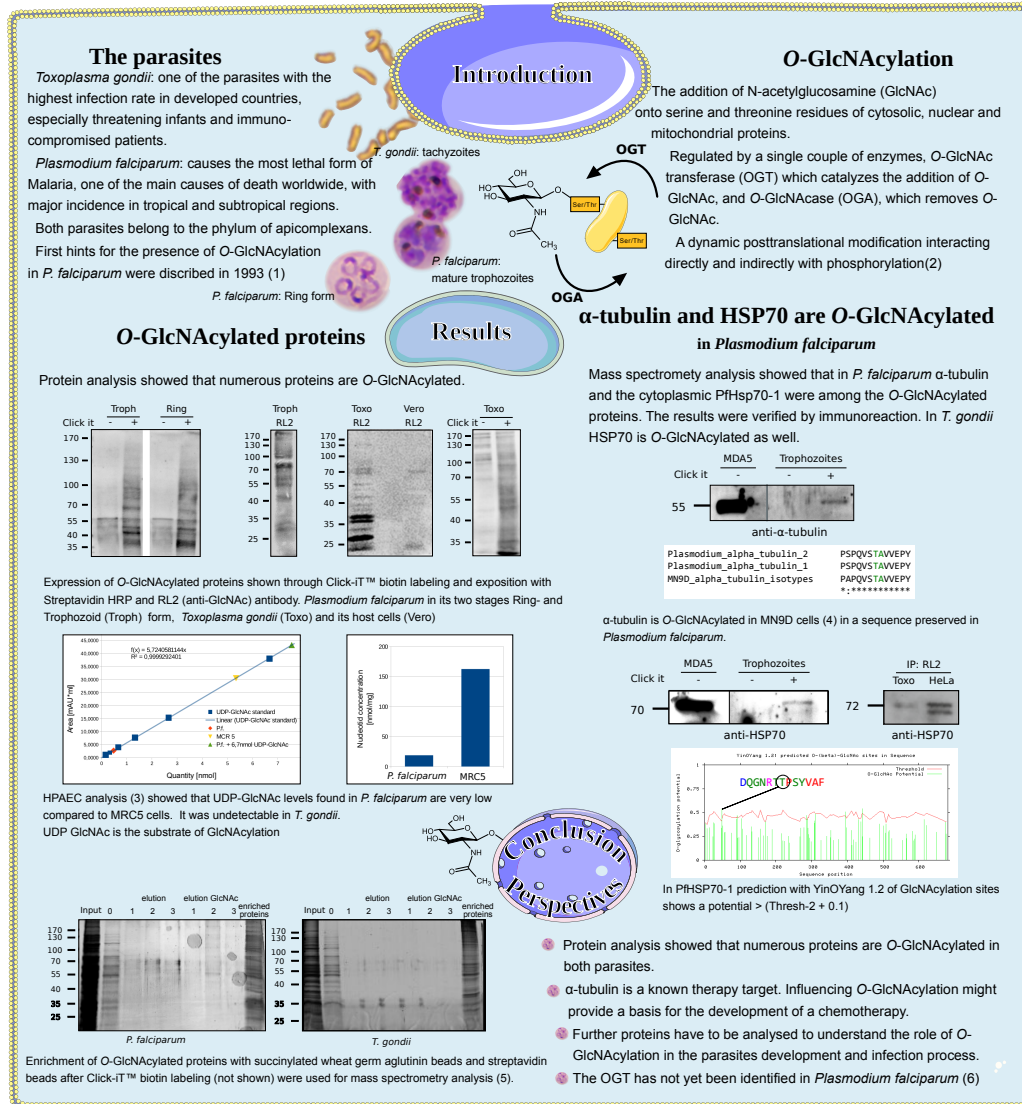
Teil III

APPENDIX

Characterization of O-GlcNAcylation in the apicomplexans *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*

Moyira Osny AQUINO-GIL*^{1,3}, Mattis KUPFERSCHMID*², Frédéric KRZEWINSKI¹, Jörg SCHMIDT², Hosam SHAMS-ELDIN², Nao YAMAKAWA¹, Yobana PEREZ-CERVERA³ Ralph T. SCHWARZ^{1,2}, and Tony LEFEBVRE¹

*Both authors contributed equally to this work. ¹Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle-UMR CNRS 8576 Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France. ²Institut für Virologie - AG Parasitologie, Fachbereich 20-Medizin Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany. ³Centro de Investigación UNAM-UABJO, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, México.



References: (1) Diekmann-Schuppert et al. (1993). Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Eur. J. Biochem. 216,779-788. (2) Ma, J., & Hart, G. W. (2014). O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. Clinical Proteomics, 11(8), 1-16. (3) Lefebvre T. et al (2013). Antibodies and Activity Measurements for the Detection of O-GlcNAc Transferase and Assay of its Substrate, UDP-GlcNAc. Glycosyltransferases Methods and Protocols Chapter 12. (4) J. S. et al. (2011) O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization Amino Acids, 40, 809-818. (5) Vercoeur-Eduard, A.-S., et al. (2015). Detection and identification of O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. Proteomics, 15, 1039-1050. (6) Perez-Cervera, et al. (2011). Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan Toxoplasma gondii: a biochemical and bioinformatic study. Amino Acids, 40(3), 847-56.

with financial support of:



All images by M. Kupferschmid and M. Aquino-Gil. Cell templates by S. Vetter. Medical Art under Creative Commons license. Adapted by M. Kupferschmid.



27th Joint Glycobiology Meeting, 16-18 October.

Nijmegen, The Netherlands

12:10 - 12:30 **Robert de Vries** – Utrecht, 'H3N2 and 2009 Pandemic H1N1 Viruses Share Specificity for Extended Branched Human-Type Receptors'

12:30 – 13:30 Lunch

13:30 - 14:20 Poster session 1 (room 8)

Session 3 The O-GlcNAc modification, session chair: François Foulquier (room 1 and 2)

14:20 - 14:50 (Invited Lecture) **Daan van Aalten** – University of Dundee 'O-GlcNAc signalling in (neuro)development'

14.50 - 15:10 **Manuel Shorlemer** – Leibniz, 'Chemistry based tools to explore tyrosine O-glycosylation'

15:10 - 15:30 **Anke Willems** – Nijmegen, 'Mutations in OGT , encoding O-linked N-acetylglucosamine transferase, are associated with X-linked intellectual disability'

15:30 - 15:50 **Mattis Kupferschmid** - Marburg, 'Identification of O-GlcNAcylated proteins in the apicomplexans Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii'

Identification of O-GlcNAcylated proteins in the apicomplexans *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*

Moyira Osny AQUINO-GIL*^{1,3}, Mattis KUPFERSCHMID*², Frédéric KRZEWINSKI¹, Jörg SCHMIDT², Hosam SHAMS-ELDIN², Nao YAMAKAWA¹, Yobana PEREZ-CERVERA³ Ralph T. SCHWARZ^{1,2}, and Tony LEFEBVRE¹

*Both authors contributed equally to this work. ¹Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle-UMR CNRS 8576 Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France. ²Institut für Virologie - AG Parasitologie, Fachbereich 20-Medizin Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany. ³Centro de Investigación UNAM-UABJO, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, México.

The parasites

Toxoplasma gondii: one of the parasites with the highest infection rate in developed countries, especially threatening infants and immunocompromised patients.

Plasmodium falciparum: causes the most lethal form of Malaria, one of the main causes of death worldwide, with major incidence in tropical and subtropical regions.

Both parasites belong to the phylum of apicomplexans. First hints for the presence of O-GlcNAcylation in *P. falciparum* were described in 1993 (1).

Introduction

O-GlcNAcylation

The addition of N-acetylglucosamine (GlcNAc) onto serine and threonine residues of cytosolic, nuclear and mitochondrial proteins.

Regulated by a single couple of enzymes, O-GlcNAc transferase (OGT) which catalyzes the addition of O-GlcNAc, and O-GlcNAcase (OGA), which removes O-GlcNAc.

A dynamic posttranslational modification interacting directly and indirectly with phosphorylation (2).

O-GlcNAcylated proteins

Protein analysis showed that numerous proteins are O-GlcNAcylated.

Mass spectrometry analysis showed that in *P. falciparum* α -tubulin and the cytoplasmic PfHsp70-1 were among the O-GlcNAcylated proteins. The results were verified by immunoreaction. In *T. gondii* HSP70 is O-GlcNAcylated as well.

α -tubulin is O-GlcNAcylated in MN9D cells (4) in a sequence preserved in *Plasmodium falciparum*.

Results

Expression of O-GlcNAcylated proteins shown through Click-IT™ biotin labeling and exposition with Streptavidin HRP and RL2 (anti-GlcNAc) antibody. *Plasmodium falciparum* in its two stages Ring- and Trophozoite (Troph) form, *Toxoplasma gondii* (Toxo) and its host cells (Vero).

HPAEC analysis (3) showed that UDP-GlcNAc levels found in *P. falciparum* are very low compared to MRC5 cells. It was undetectable in *T. gondii*. UDP GlcNAc is the substrate of GlcNAcylation.

Conclusion Perspectives

- O-GlcNAcylation has an influence on the reproduction rate.
- Protein analysis showed that numerous proteins are O-GlcNAcylated in both parasites.
- α -tubulin is a known therapy target. Influencing O-GlcNAcylation might provide a basis for the development of a chemotherapy.
- Further proteins have to be analysed to understand the role of O-GlcNAcylation in the parasites development and infection process.
- The OGT has not yet been identified in *Plasmodium falciparum* (6).

References: (1) Dieckmann-Schuppert et al. (1993). Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Eur. J. Biochem, 216, 779-788. (2) Ma, J., & Hart, G. W. (2014). O-GlcNAc profiling : from proteins to proteomes. Clinical Proteomics, 11(8), 1-16. (3) Lefebvre T, et al (2013). Antibodies and Activity Measurements for the Detection of O-GlcNAc Transferase and Assay of its Substrate, UDP-GlcNAc. Glycosyltransferases Methods and Protocols Chapter 12 (4) J. S., et al. (2011) O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization Amino Acids, 40, 809-818. (5) Vercoutter-Edouart, A.-S., et al. (2015). Detection and identification of O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. Proteomics, 15, 1039-1050. (6) Perez-Cervera, et al. (2011). Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan Toxoplasma gondii: a biochemical and bioinformatic study. Amino Acids, 40(3), 847-56.

with financial support of:



All images by M. Kupferschmid and M. Aquino-Gil. Cell templates by Servier Medical Art under Creative Commons Licence. Adapted by M. Kupferschmid.

RESEARCH

Open Access



Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*

Mattis Kupferschmid¹, Moyira Osny Aquino-Gil^{2,3,4}, Hosam Shams-Eldin¹, Jörg Schmidt¹, Nao Yamakawa², Frédéric Krzewinski², Ralph T. Schwarz^{1,2†} and Tony Lefebvre^{2*†}

Abstract

Background: Post-translational modifications (PTMs) constitute a huge group of chemical modifications increasing the complexity of the proteomes of living beings. PTMs have been discussed as potential anti-malarial drug targets due to their involvement in many cell processes. O-GlcNAcylation is a widespread PTM found in different organisms including *Plasmodium falciparum*. The aim of this study was to identify O-GlcNAcylated proteins of *P. falciparum*, to learn more about the modification process and to understand its eventual functions in the Apicomplexans.

Methods: The *P. falciparum* strain 3D7 was amplified in erythrocytes and purified. The proteome was checked for O-GlcNAcylation using different methods. The level of UDP-GlcNAc, the donor of the sugar moiety for O-GlcNAcylation processes, was measured using high-pH anion exchange chromatography. O-GlcNAcylated proteins were enriched and purified utilizing either click chemistry labelling or adsorption on succinyl-wheat germ agglutinin beads. Proteins were then identified by mass-spectrometry (nano-LC MS/MS).

Results: While low when compared to MRC5 control cells, *P. falciparum* disposes of its own pool of UDP-GlcNAc. By using proteomics methods, 13 O-GlcNAcylated proteins were unambiguously identified (11 by click-chemistry and 6 by sWGA-beads enrichment; 4 being identified by the 2 approaches) in late trophozoites. These proteins are all part of pathways, functions and structures important for the parasite survival. By probing clicked-proteins with specific antibodies, Hsp70 and α -tubulin were identified as *P. falciparum* O-GlcNAc-bearing proteins.

Conclusions: This study is the first report on the identity of *P. falciparum* O-GlcNAcylated proteins. While the parasite O-GlcNAcome seems close to those of other species, the structural differences exhibited by the proteomes provides a glimpse of innovative therapeutic paths to fight malaria. Blocking biosynthesis of UDP-GlcNAc in the parasites is another promising option to reduce *Plasmodium* life cycle.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, O-GlcNAcylation, Proteomics, α -Tubulin, Hsp70, Glycolysis

Zugang zur vollständigen Publikation:
<https://doi.org/10.1186/s12936-017-2131-2>

*Correspondence: tony.lefebvre@univ-lille1.fr

†Ralph T. Schwarz and Tony Lefebvre contributed equally to this work

² Univ. Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2017. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Zugang zur vollständigen Publikation:
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00450>

Apart From Rhoptries, Identification of *Toxoplasma gondii*'s O-GlcNAcylated Proteins Reinforces the Universality of the O-GlcNAcome

OPEN ACCESS

Edited by:

Xiaoyong Yang,
Yale School of Medicine, Yale
University, United States

Reviewed by:

Chad Slawson,
Kansas University of Medical Center
Research Institute, United States
Michelle R. Bond,
National Institutes of Health (NIH),
United States

*Correspondence:

Tony Lefebvre
tony.lefebvre@univ-lille.fr

†These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Structural
Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 14 May 2018

Accepted: 20 July 2018

Published: 20 August 2018

Citation:

Aquino-Gil MO, Kupferschmid M,
Shams-Eldin H, Schmidt J,
Yamakawa N, Mortuaire M,
Krzewinski F, Hardivillé S, Zenteno E,
Rolando C, Bray F, Pérez Campos E,
Dubremetz J-F, Pérez-Cervera Y,
Schwarz RT and Lefebvre T (2018)
Apart From Rhoptries, Identification of
Toxoplasma gondii's O-GlcNAcylated
Proteins Reinforces the Universality of
the O-GlcNAcome.
Front. Endocrinol. 9:450.
doi: 10.3389/fendo.2018.00450

Moyira Osny Aquino-Gil^{1,2,3}, Mattis Kupferschmid⁴, Hosam Shams-Eldin⁴, Jörg Schmidt⁴, Nao Yamakawa¹, Marlène Mortuaire¹, Frédéric Krzewinski¹, Stéphan Hardivillé¹, Edgar Zenteno⁵, Christian Rolando⁶, Fabrice Bray⁶, Eduardo Pérez Campos^{2,3}, Jean-François Dubremetz⁷, Yobana Perez-Cervera^{2,3}, Ralph T. Schwarz^{1,4†} and Tony Lefebvre^{1*†}

¹ Univ. Lille, CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, France, ² Instituto Tecnológico de Oaxaca, Tecnológico Nacional de México, Oaxaca, Mexico, ³ Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, Mexico, ⁴ Laboratory of Parasitology, Institute for Virology, Philipps-University, Marburg, Germany, ⁵ Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ⁶ CNRS, MSAP USR 3290, FR 3688 FRABIO, FR 2638 Institut Eugène-Michel Chevreul, Université de Lille, Lille, France, ⁷ Unité Mixte de Recherche 5235, Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université Montpellier, Montpellier, France

O-linked β -N-acetylglucosamylation or O-GlcNAcylation is a widespread post-translational modification that belongs to the large and heterogeneous group of glycosylations. The functions managed by O-GlcNAcylation are diverse and include regulation of transcription, replication, protein's fate, trafficking, and signaling. More and more evidences tend to show that deregulations in the homeostasis of O-GlcNAcylation are involved in the etiology of metabolic diseases, cancers and neuropathologies. O-GlcNAc transferase or OGT is the enzyme that transfers the N-acetylglucosamine residue onto target proteins confined within the cytosolic and nuclear compartments. A form of OGT was predicted for *Toxoplasma* and recently we were the first to show evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexans *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. Numerous studies have explored the O-GlcNAcome in a wide variety of biological models but very few focus on protists. In the present work, we used enrichment on sWGA-beads and immunopurification to identify putative O-GlcNAcylated proteins in *Toxoplasma gondii*. Many of the proteins found to be O-GlcNAcylated were originally described in higher eukaryotes and participate in cell shape organization, response to stress, protein synthesis and metabolism. In a more original way, our proteomic analyses, confirmed by sWGA-enrichment and click-chemistry, revealed that rhoptries, proteins necessary for invasion, are glycosylated. Together, these data show that regardless of proteins strictly specific to organisms, O-GlcNAcylated proteins are rather similar among living beings.

Keywords: *T. gondii*, O-GlcNAcome, O-GlcNAcylation, proteomics, toxoplasmosis, rhoptries

LITERATUR

- [1] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman und Shiv Pillai. *Cellular and molecular immunology*: 6. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. ISBN: 9781416031222.
- [2] Jane Achan, Ambrose O. Talisuna, Annette Erhart, Adoke Yeka, James K. Tibenderana, Frederick N. Baliraine, Philip J. Rosenthal und Umberto D'Alessandro. "Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria". In: *Malaria journal* 10 (2011), S. 144. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/1475-2875-10-144](https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-144).
- [3] Sina M. Adl, Alastair G. B. Simpson, Christopher E. Lane, Julius Lukeš, David Bass, Samuel S. Bowser, Matthew W. Brown, Fabien Burki, Micah Dunthorn, Vladimir Hampl, Aaron Heiss, Mona Hoppenrath u. a. "The revised classification of eukaryotes". In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 59.5 (2012), S. 429-493. DOI: [10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x).
- [4] "Wichtige Gifte und Vergiftungen". In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Hrsg. von Klaus Aktories, Ulrich Förstermann, Franz Hofmann und Klaus Starke. Elsevier, 2013, S. 967-1099. ISBN: 9783437425233. DOI: [10.1016/B978-3-437-42523-3.00036-1](https://doi.org/10.1016/B978-3-437-42523-3.00036-1).
- [5] H. K. Alles, K. N. Mendis und R. Carter. "Malaria Mortality Rates in South Asia and in Africa: Implications for Malaria Control". In: *Parasitology Today* 14.9 (1998), S. 369-375. ISSN: 01694758. DOI: [10.1016/S0169-4758\(98\)01296-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(98)01296-4).
- [6] Jana Alonso, Marianne Schimpl und Daan M. F. van Aalten. "O-GlcNAcase: Promiscuous hexosaminidase or key regulator of O-GlcNAc signaling? Role of O-GlcNAcase in O-GlcNAc Signaling". In: *The Journal of biological chemistry* 289.50 (2014), S. 34433-34439. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.R114.609198](https://doi.org/10.1074/jbc.R114.609198).
- [7] Eduardo Alves, Fernando V. Maluf, Vania B. Bueno, Rafael V. C. Guido, Glaucius Oliva, Maneesh Singh, Pedro Scarpelli, Fahyme Costa, Robson Sartorello, Luiz H. Catalani, Declan Brady, Rita Tewari u. a. "Biliverdin targets enolase and eukaryotic initiation factor 2 (eIF2alpha) to reduce the growth of intraerythrocytic development of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*". In: *Scientific reports* 6 (2016), S. 22093. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep22093](https://doi.org/10.1038/srep22093).

- [8] Franck Amblard, Jong Hyun Cho und Raymond F. Schinazi. "Cu(I)-catalyzed Huisgen azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide, and oligonucleotide chemistry". In: *Chemical reviews* 109.9 (2009), S. 4207–4220. DOI: [10.1021/cr9001462](https://doi.org/10.1021/cr9001462).
- [9] Sudharsana R. Ande, Saby Moulik und Suresh Mishra. "Interaction between O-GlcNAc modification and tyrosine phosphorylation of prohibitin: implication for a novel binary switch". In: *PloS one* 4.2 (2009), e4586. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0004586](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004586).
- [10] Moyira Osny Aquino Gil. "Caractérisation de la O-GlcNAcylation et des OGTs chez l'apicomplexe *Toxoplasma gondii* et les modèles végétaux *Arabidopsis thaliana* et *Chlamydomonas reinhardtii*". Diss. Lille: Lille 1, 2018. URL: <http://www.theses.fr/2018LIL1S106/document> (besucht am 09. 01. 2020).
- [11] Moyira Osny Aquino Gil, Mattis Kupferschmid, Hosam Shams-Eldin, Jörg Schmidt, Nao Yamakawa, Marlène Mortuaire, Frédéric Krzewinski, Stéphan Hardivillé, Edgar Zenteno, Christian Rolando, Fabrice Bray, Eduardo Pérez Campos u. a. "Apart From Rhoptries, Identification of *Toxoplasma gondii*'s O-GlcNAcylated Proteins Reinforces the Universality of the O-GlcNAcome". In: *Frontiers in endocrinology* 9 (2018), S. 450. ISSN: 1664-2392. DOI: [10.3389/fendo.2018.00450](https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00450).
- [12] Moyira Aquino Gil, Annick Pierce, Yobana Perez-Cervera, Edgar Zenteno und Tony Lefebvre. "OGT: A short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases". In: *Biochemical Society transactions* 45.2 (2017), S. 365–370. DOI: [10.1042/BST20160404](https://doi.org/10.1042/BST20160404).
- [13] Nobuko Arisue und Tetsuo Hashimoto. "Phylogeny and evolution of apicomplasts and apicomplexan parasites". In: *Parasitology international* 64.3 (2015), S. 254–259. DOI: [10.1016/j.parint.2014.10.005](https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.005).
- [14] Alexzander Asea, Michael Rehli, Edith Kabingu, Jason A. Boch, Olivia Bare, Philip E. Auron, Mary Ann Stevenson und Stuart K. Calderwood. "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4". In: *The Journal of biological chemistry* 277.17 (2002), S. 15028–15034. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M200497200](https://doi.org/10.1074/jbc.M200497200).
- [15] Francis K. Atieli, Stephen O. Munga, Ayub V. Ofulla und John M. Vulule. "The effect of repeated washing of long-lasting insecticide-treated nets (LLINs) on the feeding success and survival rates of *Anopheles gambiae*". In: *Malaria journal* 9 (2010), S. 304. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/1475-2875-9-304](https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-304).
- [16] Ralph Emmett Avery. *America's triumph at Panama panorama and story of the construction and operation of the world's giant waterway from ocean to ocean*. Chicago: Regan Printing House, 1913. URL: <http://worldcatlibraries.org/wcpa/oclc/1004686>.

- [17] Olaf Bach, Michael Baier, Annika Pullwitt, Nedson Fosiko, George Chagaluka, Matthew Kalima, Wolfgang Pfister, Eberhard Straube und Malcolm Molyneux. "Falciparum malaria after splenectomy: a prospective controlled study of 33 previously splenectomized Malawian adults". In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99.11 (2005), S. 861–867. ISSN: 00359203. DOI: [10.1016/j.trstmh.2005.03.008](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.03.008).
- [18] J. K. Baird, T. R. Jones, E. W. Danudirgo, B. A. Annis, M. J. Bangs, H. Basri, Purnomo und S. Masbar. "Age-dependent acquired protection against Plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyperendemic malaria". In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 45.1 (1991), S. 65–76. ISSN: 0002-9637. DOI: [10.4269/ajtmh.1991.45.65](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.65).
- [19] David A. Baker. "Malaria gametocytogenesis". In: *Molecular and biochemical parasitology* 172.2 (2010), S. 57–65. ISSN: 0166-6851. DOI: [10.1016/j.molbiopara.2010.03.019](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019).
- [20] Steffi F. Baldini, Agata Steenackers, Stéphanie Olivier-Van Stichelen, Anne-Marie Mir, Marlène Mortuaire, Tony Lefebvre und Céline Guinez. "Glucokinase expression is regulated by glucose through O-GlcNAc glycosylation". In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478.2 (Sep. 2016), S. 942–948. DOI: [10.1016/j.bbrc.2016.08.056](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.056).
- [21] Gowrishankar Banumathy, Varsha Singh, Soundara Raghavan Pavithra und Utpal Tatu. "Heat shock protein 90 function is essential for Plasmodium falciparum growth in human erythrocytes". In: *The Journal of biological chemistry* 278.20 (2003), S. 18336–18345. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M211309200](https://doi.org/10.1074/jbc.M211309200).
- [22] Stefan Baumeister, Preetish Gangopadhyay, Urska Repnik und Klaus Lingelbach. "Novel insights into red blood cell physiology using parasites as tools". In: *European journal of cell biology* 94.7-9 (2015), S. 332–339. ISSN: 0171-9335. DOI: [10.1016/j.ejcb.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.05.007).
- [23] N. A. Beare, T. E. Taylor, S. P. Harding, S. Lewallen und M. E. Molyneux. "Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria". In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75.5 (2006), S. 790–797. ISSN: 0002-9637. DOI: [10.4269/ajtmh.2006.75.790](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.790).
- [24] Katja Becker, Leann Tilley, Jonathan L. Vennerstrom, David Roberts, Stephen Rogerson und Hagai Ginsburg. "Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions". In: *International Journal for Parasitology* 34.2 (2004), S. 163–189. ISSN: 00207519. DOI: [10.1016/j.ijpara.2003.09.011](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.09.011).

- [25] J. C. Beier, G. F. Killeen und J. I. Githure. "Short report: Entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa". In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 61.1 (1999), S. 109–113. ISSN: 0002-9637. DOI: [10.4269/ajtmh.1999.61.109](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.109).
- [26] A. Bell. "Microtubule Inhibitors as Potential Antimalarial Agents". In: *Parasitology Today* 14.6 (1998), S. 234–240. ISSN: 01694758. DOI: [10.1016/S0169-4758\(98\)01246-0](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(98)01246-0).
- [27] Beatrice Bercovich, Ilana Stancovski, Arie Mayer Nava Blumenfeld und Andrei Laszlo. "Ubiquitin-dependent Degradation of Certain Protein Substrates in Vitro Requires the Molecular Chaperone Hsc70". In: *Journal of Biological Chemistry* 272.14 (1997), S. 9002–9010. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.272.14.9002](https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9002).
- [28] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko und Lubert Stryer. *Biochemie*. 7. Aufl., korr. Nachdr. Berlin u.a.: Springer Spektrum, 2014. ISBN: 978-3-8274-2988-9.
- [29] S. Böhm. "Pestizide". In: *Pharmakologie und Toxikologie*. Hrsg. von Michael Freissmuth, Stefan Offermanns und Stefan Böhm. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg und s.l.: Springer Berlin Heidelberg, 2016, S. 899–905. ISBN: 978-3-662-46688-9. DOI: [10.1007/978-3-662-46689-6_68](https://doi.org/10.1007/978-3-662-46689-6_68).
- [30] O. Billker, V. Lindo, M. Panico, A. E. Etienne, T. Paxton, A. Dell, M. Rogers, R. E. Sinden und H. R. Morris. "Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito". In: *Nature* 392.6673 (1998), S. 289–292. DOI: [10.1038/32667](https://doi.org/10.1038/32667).
- [31] James Biwi, Christophe Biot, Yann Guerardel, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart und Tony Lefebvre. "The Many Ways by Which O-GlcNAcylation May Orchestrate the Diversity of Complex Glycosylations". In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23.11 (2018). DOI: [10.3390/molecules23112858](https://doi.org/10.3390/molecules23112858).
- [32] Z. Q. Bonday, S. Dhanasekaran, P. N. Rangarajan und G. Padmanaban. "Import of host delta-aminolevulinate dehydratase into the malarial parasite: Identification of a new drug target". In: *Nature medicine* 6.8 (2000), S. 898–903. ISSN: 1078-8956. DOI: [10.1038/78659](https://doi.org/10.1038/78659).
- [33] Jurgen Bosch, Carlos A. Buscaglia, Brian Krumm, Bjarni P. Ingason, Robert Lucas, Claudia Roach, Timothy Cardozo, Victor Nussenzweig und Wim G. J. Hol. "Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104.17 (2007), S. 7015–7020. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.0605301104](https://doi.org/10.1073/pnas.0605301104).

- [34] Teun Bousema und Chris Drakeley. "Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination". In: *Clinical microbiology reviews* 24.2 (2011), S. 377–410. ISSN: 0893-8512. DOI: [10.1128/CMR.00051-10](https://doi.org/10.1128/CMR.00051-10).
- [35] Michelle J. Boyle, Danny W. Wilson, Jack S. Richards, David T. Riglar, Kevin K. A. Tetteh, David J. Conway, Stuart A. Ralph, Jake Baum und James G. Beeson. "Isolation of viable Plasmodium falciparum merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107.32 (2010), S. 14378–14383. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1009198107](https://doi.org/10.1073/pnas.1009198107).
- [36] P. G. Bray, S. A. Ward und P. M. O'Neill. "Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history". In: *Current topics in microbiology and immunology* 295 (2005), S. 3–38. ISSN: 0070-217X. DOI: [10.1007/3-540-29088-5_1](https://doi.org/10.1007/3-540-29088-5_1).
- [37] M. C. Bruce, P. Alano, S. Duthie und R. Carter. "Commitment of the malaria parasite Plasmodium falciparum to sexual and asexual development". In: *Parasitology* 100 Pt 2 (1990), S. 191–200. ISSN: 0031-1820. DOI: [10.1017/S0031182000061199](https://doi.org/10.1017/S0031182000061199).
- [38] P. A. Burghaus und K. Lingelbach. "Luciferase, when fused to an N-terminal signal peptide, is secreted from transfected Plasmodium falciparum and transported to the cytosol of infected erythrocytes". In: *The Journal of biological chemistry* 276.29 (2001), S. 26838–26845. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M100111200](https://doi.org/10.1074/jbc.M100111200).
- [39] G. Guy Bushkin, Daniel M. Ratner, Jike Cui, Sulagna Banerjee, Manoj T. Duraisingh, Cameron V. Jennings, Jeffrey D. Dvorin, Marc-Jan Gubbels, Seth D. Robertson, Martin Steffen, Barry R. O'Keefe, Phillips W. Robbins u. a. "Suggestive evidence for Darwinian Selection against asparagine-linked glycans of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii". In: *Eukaryotic cell* 9.2 (2010), S. 228–241. DOI: [10.1128/EC.00197-09](https://doi.org/10.1128/EC.00197-09).
- [40] Teresa Gil Carvalho, Belinda Morahan, Simona John von Freyend, Philippe Boeuf, Georges Grau, Jose Garcia-Bustos und Christian Doerig. "The ins and outs of phosphosignalling in Plasmodium: Parasite regulation and host cell manipulation". In: *Molecular and biochemical parasitology* 208.1 (2016), S. 2–15. ISSN: 0166-6851. DOI: [10.1016/j.molbiopara.2016.05.006](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.05.006).
- [41] Marcia Caldas de Castro und Monica G. Fisher. "Is malaria illness among young children a cause or a consequence of low socioeconomic status? evidence from the united Republic of Tanzania". In: *Malaria journal* 11 (2012), S. 161. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/1475-2875-11-161](https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-161).

- [42] Thomas Cavalier-Smith. "Kingdom Chromista and its eight phyla: A new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences". In: *Protoplasma* 255.1 (2018), S. 297–357. DOI: [10.1007/s00709-017-1147-3](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1147-3).
- [43] Caroline Cieniewski-Bernard, Bruno Bastide, Tony Lefebvre, Jérôme Lemoine, Yvonne Mounier und Jean-Claude Michalski. "Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry". In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3.6 (2004), S. 577–585. ISSN: 1535-9476. DOI: [10.1074/mcp.M400024-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.M400024-MCP200).
- [44] G. R. Coatney. "Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine". In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 12 (1963), S. 121–128. ISSN: 0002-9637. DOI: [10.4269/ajtmh.1963.12.121](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1963.12.121).
- [45] S. Cohen, I. A. McGregor und S. Carrington. "Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria". In: *Nature* 192.4804 (1961), S. 733–737. DOI: [10.1038/192733a0](https://doi.org/10.1038/192733a0).
- [46] Gordon C. Cook, Alimuddin I. Zumla und Patrick Manson. *Manson's tropical diseases: 22nd. 22. ed., reprinted*. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2009. ISBN: 9781416044710.
- [47] Brian M. Cooke, Narla Mohandas und Ross L. Coppel. "Malaria and the red blood cell membrane". In: *Seminars in Hematology* 41.2 (2004), S. 173–188. ISSN: 00371963. DOI: [10.1053/j.seminhematol.2004.01.004](https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2004.01.004).
- [48] Marta Cova, Joao A. Rodrigues, Terry K. Smith und Luis Izquierdo. "Sugar activation and glycosylation in Plasmodium". In: *Malaria journal* 14 (2015), S. 427. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/s12936-015-0949-z](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0949-z).
- [49] A. F. Cowman und S. J. Foote. "Chemotherapy and drug resistance in malaria". In: *International Journal for Parasitology* 20.4 (1990), S. 503–513. ISSN: 00207519. DOI: [10.1016/0020-7519\(90\)90198-V](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90198-V).
- [50] Alan F. Cowman und Brendan S. Crabb. "Invasion of red blood cells by malaria parasites". In: *Cell* 124.4 (2006), S. 755–766. DOI: [10.1016/j.cell.2006.02.006](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006).
- [51] D. Crotti. "La Malaria, ossia la mal'aria: Brevi note di una storia sociale e popolare: [A history of Malaria from and for a popular point of view]". In: *Le Infezioni in Medicina* 13.4 (2005), S. 265–270. DOI: [10.4081/mm.2007.2613](https://doi.org/10.4081/mm.2007.2613).
- [52] C. F. Curtis. "Restoration of malaria control in the Madagascar highlands by DDT spraying". In: (*The American journal of tropical medicine and hygiene*) 66.1 (2002), S. 1. ISSN: 0002-9637. DOI: [10.4269/ajtmh.2002.66.1](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.1).

- [53] Christopher F. Curtis. "Control of Malaria Vectors in Africa and Asia". In: *Radcliffe's IPM World Textbook*. Hrsg. von E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison und R. E. Cancelado. St. Paul, MN. URL: <https://ipmworld.umn.edu/curtis-malaria-vectors> (besucht am 22. 02. 2019).
- [54] Christopher F. Curtis und Abraham E.P. Mnzava. "Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control". In: *Bulletin of the World Health Organization* 78.12 (2000), S. 1389–1400. ISSN: 0042-9686. DOI: [10.1590/S0042-96862000001200006](https://doi.org/10.1590/S0042-96862000001200006).
- [55] G. D'Andrea, L. Gemini, A. M. D'Alessandro und A. Oratore. "Deglycosylation of hen ovotransferrin under mild conditions: Effect on the immunoreactivity and biological activity". In: *Glycobiology* 9.8 (1999), S. v–viii. ISSN: 0959-6658. DOI: [10.1093/oxfordjournals.glycob.a018871](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.glycob.a018871).
- [56] DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. *Malaria, Diagnostic Findings, Microscopy*. Hrsg. von Centers for Disease Control and Prevention 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027, USA. 2016. (Besucht am 28. 08. 2016).
- [57] N. P. Day, N. H. Phu, N. T. Mai, T. T. Chau, P. P. Loc, L. V. Chuong, D. X. Sinh, P. Holloway, T. T. Hien und N. J. White. "The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria". In: *Critical care medicine* 28.6 (2000), S. 1833–1840. ISSN: 0090-3493. DOI: [10.1097/00003246-200006000-00025](https://doi.org/10.1097/00003246-200006000-00025).
- [58] Vanessa Dehennaut, Tony Lefebvre, Chantal Sellier, Yves Leroy, Benjamin Gross, Suzanne Walker, Rene Cacan, Jean-Claude Michalski, Jean-Pierre Vilain und Jean-Francois Bodart. "O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes". In: *The Journal of biological chemistry* 282.17 (2007), S. 12527–12536. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M700444200](https://doi.org/10.1074/jbc.M700444200).
- [59] Vanessa Dehennaut, Marie-Christine Slomianny, Adeline Page, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Catherine Jesus, Jean-Claude Michalski, Jean-Pierre Vilain, Jean-Francois Bodart und Tony Lefebvre. "Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte". In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7.11 (2008), S. 2229–2245. ISSN: 1535-9476. DOI: [10.1074/mcp.M700494-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.M700494-MCP200).
- [60] Hernando A. Del Portillo, Mireia Ferrer, Thibaut Brugat, Lorena Martin-Jaular, Jean Langhorne und Marcus V. G. Lacerda. "The role of the spleen in malaria". In: *Cellular microbiology* 14.3 (2012), S. 343–355. ISSN: 1462-5814. DOI: [10.1111/j.1462-5822.2011.01741.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01741.x).

- [61] Enda Dempsey, Miguel Prudencio, Brian J. Fennell, Carina S. Gomes-Santos, James W. Barlow und Angus Bell. "Antimitotic herbicides bind to an unidentified site on malarial parasite tubulin and block development of liver-stage *Plasmodium* parasites". In: *Molecular and biochemical parasitology* 188.2 (2013), S. 116–127. ISSN: 0166-6851. DOI: [10.1016/j.molbiopara.2013.03.001](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.03.001).
- [62] Wakgari Deressa, Yemane Y. Yihdego, Zelalem Kebede, Esey Batisso, Agonafer Tekalegne und Getachew A. Dagne. "Effect of combining mosquito repellent and insecticide treated net on malaria prevalence in Southern Ethiopia: a cluster-randomised trial". In: *Parasites & vectors* 7 (2014), S. 132. ISSN: 1756-3305. DOI: [10.1186/1756-3305-7-132](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-132).
- [63] Katrien Deroost, Thao-Thy Pham, Ghislain Opdenakker und Philippe E. van den Steen. "The immunological balance between host and parasite in malaria". In: *FEMS microbiology reviews* 40.2 (2016), S. 208–257. ISSN: 0168-6445. DOI: [10.1093/femsre/fuv046](https://doi.org/10.1093/femsre/fuv046).
- [64] Fabio Di Domenico, Joshua B. Owen, Rukhsana Sultana, Rena A. Sowell, Marzia Perluigi, Chiara Cini, Jian Cai, William M. Pierce und D. Allan Butterfield. "The wheat germ agglutinin-fractionated proteome of subjects with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment hippocampus and inferior parietal lobule: Implications for disease pathogenesis and progression". In: *Journal of neuroscience research* 88.16 (2010), S. 3566–3577. ISSN: 0360-4012. DOI: [10.1002/jnr.22528](https://doi.org/10.1002/jnr.22528).
- [65] Angela Dieckmann-Schuppert, Ernst Bause und Ralph T. Schwarz. "Studies on o-glycans of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes Evidence for o-GlcNAc and o-GlcNAc-transferase in malaria parasites". In: *European Journal of Biochemistry* 216.3 (1993), S. 779–788. ISSN: 0014-2956. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1993.tb18198.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18198.x).
- [66] Angela Dieckmann-Schuppert, Stephanie Bender, Maria Odenthal-Schnittler, Ernst Bause und Ralph T. Schwarz. "Apparent lack of N-glycosylation in the asexual intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*". In: *European Journal of Biochemistry* 205.2 (1992), S. 815–825. ISSN: 0014-2956. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1992.tb16846.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16846.x).
- [67] A. Djimde, O. K. Doumbo, J. F. Cortese, K. Kayentao, S. Doumbo, Y. Diourte, D. Coulibaly, A. Dicko, X. Z. Su, T. Nomura, D. A. Fidock, T. E. Wellems u. a. "A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria". In: *The New England journal of medicine* 344.4 (2001), S. 257–263. ISSN: 0028-4793. DOI: [10.1056/NEJM200101253440403](https://doi.org/10.1056/NEJM200101253440403).
- [68] Janice M. Dobrowolski, Vern B. Carruthers und L. David Sibley. "Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*". In: *Molecular Microbiology* 26.01 (1997), S. 163–173. ISSN: 0950382X. DOI: [10.1046/j.1365-2958.1997.5671913.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5671913.x).

- [69] Arjen M. Dondorp, Caterina I. Fanello, Ilse C. E. Hendriksen, Ermelinda Gomes, Amir Seni, Kajal D. Chhaganlal, Kalifa Bojang, Rasaq Olaosebikan, Nkechinyere Anunobi, Kathryn Maitland, Esther Kivaya, Tsiri Agbenyega u. a. "Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): An open-label, randomised trial". In: *The Lancet* 376.9753 (2010), S. 1647–1657. ISSN: 01406736. DOI: [10.1016/S0140-6736\(10\)61924-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61924-1).
- [70] D. L. Dong und G. W. Hart. "Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol". In: *Journal of Biological Chemistry* 269.30 (1994), S. 19321–19330. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1016/S0021-9258\(17\)32170-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32170-1).
- [71] Denise L. Doolan, Carlota Dobano und J. Kevin Baird. "Acquired immunity to malaria". In: *Clinical microbiology reviews* 22.1 (2009), 13–36, Table of Contents. ISSN: 0893-8512. DOI: [10.1128/CMR.00025-08](https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08).
- [72] Katerina Dorovini-Zis, Kristopher Schmidt, Hanh Huynh, Wenjiang Fu, Richard O. Whitten, Dan Milner, Steve Kamiza, Malcolm Molyneux und Terrie E. Taylor. "The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children". In: *The American journal of pathology* 178.5 (2011), S. 2146–2158. ISSN: 0002-9440. DOI: [10.1016/j.ajpath.2011.01.016](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.016).
- [73] Fabianno F. Dutra, Leticia S. Alves, Danielle Rodrigues, Patricia L. Fernandez, Rosane B. de Oliveira, Douglas T. Golenbock, Dario S. Zamboni und Marcelo T. Bozza. "Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111.39 (2014), E4110–8. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1405023111](https://doi.org/10.1073/pnas.1405023111).
- [74] Sneha Dutta, Aneesha Tewari, Chinthapalli Balaji, Reena Verma, Anasuya Moitra, Mamta Yadav, Prakhar Agrawal, Dinkar Sahal und Gotam K. Jarori. "Strain-transcending neutralization of malaria parasite by antibodies against Plasmodium falciparum enolase". In: *Malaria journal* 17.1 (2018), S. 304. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/s12936-018-2455-6](https://doi.org/10.1186/s12936-018-2455-6).
- [75] H. Ekvall. "Malaria and anemia". In: *Current opinion in hematology* 10.2 (2003), S. 108–114. ISSN: 1065-6251. DOI: [10.1097/00062752-200303000-00002](https://doi.org/10.1097/00062752-200303000-00002).
- [76] Eric Elguero, Lucrece M. Delicat-Loembet, Virginie Rougeron, Celine Arnathau, Benjamin Roche, Pierre Becquart, Jean-Paul Gonzalez, Dieudonne Nkoghe, Lucas Sica, Eric M. Leroy, Patrick Durand, Francisco J. Ayala u. a. "Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112.22 (2015), S. 7051–7054. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1505665112](https://doi.org/10.1073/pnas.1505665112).
- [77] J. Ellis. "Proteins as molecular chaperones". In: *Nature* 328.6129 (1987), S. 378–379. DOI: [10.1038/328378a0](https://doi.org/10.1038/328378a0).

- [78] M. English. "Acidosis in severe childhood malaria". In: *QJM* 90.4 (1997), S. 263–270. ISSN: 1460-2725. DOI: [10.1093/qjmed/90.4.263](https://doi.org/10.1093/qjmed/90.4.263).
- [79] M. English, B. Muambi, S. Mithwani und K. Marsh. "Lactic acidosis and oxygen debt in African children with severe anaemia". In: *QJM* 90.9 (1997), S. 563–569. ISSN: 1460-2725. DOI: [10.1093/qjmed/90.9.563](https://doi.org/10.1093/qjmed/90.9.563).
- [80] Brenda Eskenazi, Jonathan Chevrier, Lisa Goldman Rosas, Henry A. Anderson, Maria S. Bornman, Henk Bouwman, Aimin Chen, Barbara A. Cohn, Christiaan de Jager, Diane S. Henshel, Felicia Leipzig, John S. Leipzig u. a. "The Pine River statement: human health consequences of DDT use". In: *Environmental Health Perspectives* 117.9 (2009), S. 1359–1367. ISSN: 0091-6765. DOI: [10.1289/ehp.11748](https://doi.org/10.1289/ehp.11748).
- [81] Brian J. Fennell, Julie Ann Naughton, Enda Dempsey und Angus Bell. "Cellular and molecular actions of dinitroaniline and phosphorothioamidate herbicides on *Plasmodium falciparum*: tubulin as a specific antimalarial target". In: *Molecular and biochemical parasitology* 145.2 (2006), S. 226–238. ISSN: 0166-6851. DOI: [10.1016/j.molbiopara.2005.08.020](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.020).
- [82] Naila Firdous, Stephen Gibbons und Bernadette Modell. "Falling prevalence of beta-thalassaemia and eradication of malaria in the Maldives". In: *Journal of community genetics* 2.3 (2011), S. 173–189. ISSN: 1868-310X. DOI: [10.1007/s12687-011-0054-0](https://doi.org/10.1007/s12687-011-0054-0).
- [83] A. F. Fleming, J. Storey, L. Molineaux, E. A. Iroko und E. D. E. Attai. "Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria". In: *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 73.2 (1979), S. 161–172. ISSN: 0003-4983. DOI: [10.1080/00034983.1979.11687243](https://doi.org/10.1080/00034983.1979.11687243).
- [84] Mick Foley und Leann Tilley. "Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance". In: *International Journal for Parasitology* 27.2 (1997), S. 231–240. ISSN: 00207519. DOI: [10.1016/S0020-7519\(96\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00152-X).
- [85] Mark S. Fradin. "Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide". In: *Annals of Internal Medicine* 128.11 (1998), S. 931. ISSN: 0003-4819. DOI: [10.7326/0003-4819-128-11-199806010-00013](https://doi.org/10.7326/0003-4819-128-11-199806010-00013).
- [86] Camila T. França, Connie S. N. Li Wai Suen, Amandine Carmagnac, Enmoore Lin, Benson Kiniboro, Peter Siba, Louis Schofield und Ivo Mueller. "IgG antibodies to synthetic GPI are biomarkers of immune-status to both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in young children". In: *Malaria journal* 16.1 (2017), S. 386. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/s12936-017-2042-2](https://doi.org/10.1186/s12936-017-2042-2).
- [87] Timothy B. Frick und Douglas W. Tallamy. "Density and Diversity of Nontarget Insects Killed by Suburban Electric Insect Traps". In: *Entomological news* 107.2 (1996), S. 77–82. URL: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/20638>.

- [88] Tiphaine Gaillard, Marylin Madamet und Bruno Pradines. "Tetracyclines in malaria". In: *Malaria journal* 14 (2015), S. 445. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/s12936-015-0980-0](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0980-0).
- [89] J. L. Gallup und J. D. Sachs. "The economic burden of malaria". In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 64.1_suppl (2001), S. 85–96. ISSN: 0002-9637. DOI: [10.4269/ajtmh.2001.64.85](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.64.85).
- [90] B. D. Gambill. "A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins". In: *The Journal of Cell Biology* 123.1 (1993), S. 109–117. ISSN: 0021-9525. DOI: [10.1083/jcb.123.1.109](https://doi.org/10.1083/jcb.123.1.109).
- [91] Dionicia Gamboa, Mei-Fong Ho, Jorge Bendezu, Katherine Torres, Peter L. Chiodini, John W. Barnwell, Sandra Incardona, Mark Perkins, David Bell, James McCarthy und Qin Cheng. "A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: Implications for malaria rapid diagnostic tests". In: *PloS one* 5.1 (2010), e8091. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0008091](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008091).
- [92] Javier E. Garcia, Alvaro Puentes und Manuel E. Patarroyo. "Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: Implications for vaccine design". In: *Clinical microbiology reviews* 19.4 (2006), S. 686–707. ISSN: 0893-8512. DOI: [10.1128/CMR.00063-05](https://doi.org/10.1128/CMR.00063-05).
- [93] P. C. Garnham, R. S. Bray, L. J. Bruce-Chwatt, C. C. Draper, R. Killick-Kendrick, P. G. Sergiev, N. A. Tiburskaja, P. G. Shute und M. Maryon. "A strain of *Plasmodium vivax* characterized by prolonged incubation: Morphological and biological characteristics". In: *Bulletin of the World Health Organization* 52.1 (1975), S. 21–32. ISSN: 0042-9686.
- [94] Erhard Geissler und Jeanne Guillemin. "German flooding of the Pontine Marshes in World War II". In: *Politics and the life sciences : the journal of the Association for Politics and the Life Sciences* 29.1 (2010), S. 2–23. ISSN: 0730-9384. DOI: [10.2990/29_1_2](https://doi.org/10.2990/29_1_2).
- [95] Georg Thieme Verlag, Hrsg. *Römpp Online*. 2016. (Besucht am 22. 02. 2019).
- [96] P. Gerold, A. Dieckmann-Schuppert und R. T. Schwarz. "Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors". In: *Journal of Biological Chemistry* 269.4 (1994), S. 2597–2606. ISSN: 0021-9258.
- [97] Anil K. Ghosh, Isabelle Coppens, Henrik Gardsvoll, Michael Ploug und Marcelo Jacobs-Lorena. "*Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.41 (2011), S. 17153–17158. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1103657108](https://doi.org/10.1073/pnas.1103657108).

- [98] Global Malaria Programme. *Universal Access to Malaria Diagnostic Testing: An Operational Manual*. 2. Aufl. Geneva, 2013. ISBN: 978-92-4-150209-2. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44657/9789241502092_eng.pdf?sequence=1 (besucht am 22. 02. 2019).
- [99] Michael Goman, Gordon Langsley, John E. Hyde, Nikolai K. Yankovsky, J. Werner Zolg und John G. Scaife. "The establishment of genomic DNA libraries for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and identification of individual clones by hybridisation". In: *Molecular and biochemical parasitology* 5.6 (1982), S. 391–400. ISSN: 0166-6851. DOI: [10.1016/0166-6851\(82\)90012-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(82)90012-3).
- [100] J. Gong und L. Jing. "Glutamine induces heat shock protein 70 expression via O-GlcNAc modification and subsequent increased expression and transcriptional activity of heat shock factor-1". In: *Minerva Anestesiol* 77.5 (2011), S. 488–495.
- [101] David Greenwood. "The quinine connection". In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30.4 (1992), S. 417–427. ISSN: 0305-7453. DOI: [10.1093/jac/30.4.417](https://doi.org/10.1093/jac/30.4.417).
- [102] K. D. Greis, W. Gibson und G. W. Hart. "Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952". In: *Journal of Virology* 68.12 (1994), S. 8339–8349.
- [103] D. Lys Guilbride, Pawel Gawlinski und Patrick D. L. Guilbride. "Why functional pre-erythrocytic and bloodstage malaria vaccines fail: a meta-analysis of fully protective immunizations and novel immunological model". In: *PloS one* 5.5 (2010), e10685. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0010685](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010685).
- [104] J. Guillemin. "Choosing Scientific Patrimony: Sir Ronald Ross, Alphonse Laveran, and the Mosquito-Vector Hypothesis for Malaria". In: *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 57.4 (2002), S. 385–409. ISSN: 0022-5045. DOI: [10.1093/jhmas/57.4.385](https://doi.org/10.1093/jhmas/57.4.385).
- [105] Celine Guinez, Jerome Lemoine, Jean-Claude Michalski und Tony Lefebvre. "70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine". In: *Biochemical and biophysical research communications* 319.1 (2004), S. 21–26. ISSN: 0006-291X. DOI: [10.1016/j.bbrc.2004.04.144](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.144).
- [106] Céline Guinez, Willy Morelle, Jean-Claude Michalski und Tony Lefebvre. "O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?" In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37.4 (Apr. 2005), S. 765–774. DOI: [10.1016/j.biocel.2004.12.001](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.12.001).

- [107] Celine Guinez, Willy Morelle, Jean-Claude Michalski und Tony Lefebvre. "O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?" In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 37.4 (2005), S. 765–774. ISSN: 1357-2725. DOI: [10.1016/j.biocel.2004.12.001](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.12.001).
- [108] Ramneek Gupta. "Prediction of glycosylation sites in proteomes: from post-translational modifications to protein function". PhD Thesis. 2001.
- [109] Ramneek Gupta und Søren Brunak. "Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function". In: (Dez. 2001). DOI: [10.1142/9789812799623_0029](https://doi.org/10.1142/9789812799623_0029).
- [110] Caroline Gurcel, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Catherine Fonbonne, Marlene Mortuaire, Arnaud Salvador, Jean-Claude Michalski und Jerome Lemoine. "Identification of new O-GlcNAc modified proteins using a click-chemistry-based tagging". In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 390.8 (2008), S. 2089–2097. ISSN: 1618-2642. DOI: [10.1007/s00216-008-1950-y](https://doi.org/10.1007/s00216-008-1950-y).
- [111] David S. Guttery, Magali Roques, Anthony A. Holder und Rita Tewari. "Commit and Transmit: Molecular Players in Plasmodium Sexual Development and Zygote Differentiation". In: *Trends in parasitology* 31.12 (2015), S. 676–685. ISSN: 1471-4922. DOI: [10.1016/j.pt.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.002).
- [112] Kasturi Haldar und Narla Mohandas. "Malaria, erythrocytic infection, and anemia". In: *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* (2009), S. 87–93. ISSN: 1520-4383. DOI: [10.1182/asheducation-2009.1.87](https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.87).
- [113] Robert S. Haltiwanger, Melissa A. Blomberg und Gerald W. Hart. "Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase." In: *J. Biol. Chem.* 267.13 (1992), S. 9005–9013. DOI: [10.1016/S0021-9258\(19\)50380-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50380-5).
- [114] Robert. S. Haltiwanger, Gordon. D. Holt und Gerald W. Hart. "Enzymatic Addition of O-GlcNAc to Nuclear and Cytoplasmic Proteins: Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase." In: *The Journal of biological chemistry* 265.5 (1990), S. 2563–2568. ISSN: 0021-9258.
- [115] J. A. Hanover, C. K. Cohen, M. C. Willingham und M. K. Park. "O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins". In: *J Biol Chem* 262.20 (Juli 1987), 9887–9894. PMID: 3110163. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)48017-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48017-9).
- [116] John A. Hanover, Michele E. Forsythe, Patrick T. Hennessey, Thomas M. Brodigan, Dona C. Love, Gilbert Ashwell und Michael Krause. "A Caenorhabditis elegans model of insulin resistance: altered macronutrient storage

- and dauer formation in an OGT-1 knockout". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.32 (2005), S. 11266–11271. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.0408771102](https://doi.org/10.1073/pnas.0408771102).
- [117] John A. Hanover, Michael W. Krause und Dona C. Love. "The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine". In: *Biochimica et biophysica acta* 1800.2 (2010), S. 80–95. ISSN: 0006-3002. DOI: [10.1016/j.bbagen.2009.07.017](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.017).
- [118] John A. Hanover, Song Yu, William B. Lubas, Sang-Hoon Shin, Maria Ragano-Caracciola, Jarema Kochran und Dona C. Love. "Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene". In: *Archives of biochemistry and biophysics* 409.2 (2003), S. 287–297. ISSN: 0003-9861. DOI: [10.1016/S0003-9861\(02\)00578-7](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00578-7).
- [119] Stéphan Hardivillé und Gerald W. Hart. "Nutrient regulation of gene expression by O-GlcNAcylation of chromatin". In: *Current opinion in chemical biology* 33 (2016), S. 88–94. ISSN: 1367-5931. DOI: [10.1016/j.cbpa.2016.06.005](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.005).
- [120] Stephan Hardiville und Gerald W. Hart. "Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation". In: *Cell metabolism* 20.2 (2014), S. 208–213. ISSN: 1550-4131. DOI: [10.1016/j.cmet.2014.07.014](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.014).
- [121] Gerald W. Hart. "Nutrient Regulation of Signaling & Transcription". In: *The Journal of biological chemistry* (2019). ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.AW119.003226](https://doi.org/10.1074/jbc.AW119.003226).
- [122] Lynn M. Hartweck, Ruth K. Genger, William M. Grey und Neil E. Olszewski. "SECRET AGENT and SPINDLY have overlapping roles in the development of *Arabidopsis thaliana* L. Heyn". In: *Journal of experimental botany* 57.4 (2006), S. 865–875. ISSN: 0022-0957. DOI: [10.1093/jxb/erj071](https://doi.org/10.1093/jxb/erj071).
- [123] Lynn M. Hartweck, Cheryl L. Scott und Neil E. Olszewski. "Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development". In: *Genetics* 161.3 (2002), S. 1279–1291. ISSN: 0016-6731.
- [124] Julie Hédou, Bruno Bastide, Adeline Page, Jean-Claude Michalski und Willy Morelle. "Mapping of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle". In: *Proteomics* 9.8 (2009), S. 2139–2148. ISSN: 1615-9853. DOI: [10.1002/pmic.200800617](https://doi.org/10.1002/pmic.200800617).
- [125] Peter C. Heinrich, Matthias Müller und Lutz Graeve. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. ISBN: 978-3-642-17971-6. DOI: [10.1007/978-3-642-17972-3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3).

- [126] M. Trent Herdman, Natthida Sriboonvorakul, Stije J. Leopold, Sam Douthwaite, Sanjib Mohanty, M. Mahtab Uddin Hassan, Richard J. Maude, Hugh W. F. Kingston, Katherine Plewes, Prakaykaew Charunwatthana, Kamolrat Silamut, Charles J. Woodrow u. a. "The role of previously unmeasured organic acids in the pathogenesis of severe malaria". In: *Critical care (London, England)* 19 (2015), S. 317. ISSN: 1364-8535. DOI: [10.1186/s13054-015-1023-5](https://doi.org/10.1186/s13054-015-1023-5).
- [127] Alexander Heuchert, Nuredin Abduselam, Ahmed Zeynudin, Teferi Eshetu, Thomas Loscher, Andreas Wieser, Michael Pritsch und Nicole Berens-Riha. "Molecular markers of anti-malarial drug resistance in southwest Ethiopia over time: regional surveillance from 2006 to 2013". In: *Malaria journal* 14 (2015), S. 208. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/s12936-015-0723-2](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0723-2).
- [128] Rob H. P. Hilgers, Dongqi Xing, Kaizheng Gong, Yiu-Fai Chen, John C. Chatham und Suzanne Oparil. "Acute O-GlcNAcylation prevents inflammation-induced vascular dysfunction". In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 303.5 (2012), H513–22. DOI: [10.1152/ajpheart.01175.2011](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01175.2011).
- [129] G. D. Holt. "Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O- linked N-acetylglucosamine". In: *The Journal of Cell Biology* 104.5 (1987), S. 1157–1164. ISSN: 0021-9525. DOI: [10.1083/jcb.104.5.1157](https://doi.org/10.1083/jcb.104.5.1157).
- [130] G. D. Holt, R. S. Haltiwanger, C. R. Torres und G. W. Hart. "Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1". In: *J. Biol. Chem.* 262.31 (1987), S. 14847–14850. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)48100-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48100-8).
- [131] G. D. Holt und G. W. Hart. "The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc". In: *J. Biol. Chem.* 261.17 (1986), S. 8049–8057. DOI: [10.1016/S0021-9258\(19\)57510-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)57510-X).
- [132] Rosalind E. Howes, Katherine E. Battle, Kamini N. Mendis, David L. Smith, Richard E. Cibulskis, J. Kevin Baird und Simon I. Hay. "Global Epidemiology of Plasmodium vivax". In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 95.6 Suppl (2016), S. 15–34. ISSN: 0002-9637. DOI: [10.4269/ajtmh.16-0141](https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0141).
- [133] Yong Hu, Jorge Suarez, Eduardo Fricovsky, Hong Wang, Brian T. Scott, Sunia A. Trauger, Wenlong Han, Ying Hu, Mary O. Oyeleye und Wolfgang H. Dillmann. "Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose". In: *The Journal of biological chemistry* 284.1 (2009), S. 547–555. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M808518200](https://doi.org/10.1074/jbc.M808518200).
- [134] Tomoko Ishino, Kazuhiko Yano, Yasuo Chinzei und Masao Yuda. "Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer". In: *PLoS biology* 2.1 (2004), E4. ISSN: 1544-9173. DOI: [10.1371/journal.pbio.0020004](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020004).

- [135] T. Issad, E. Masson und P. Pagesy. "O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications". In: *Diabetes & metabolism* 36.6 Pt 1 (2010), S. 423–435. ISSN: 1878-1780. DOI: [10.1016/j.diabet.2010.09.001](https://doi.org/10.1016/j.diabet.2010.09.001).
- [136] Sai Prasad N. Iyer und Gerald W. Hart. "Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity". In: *The Journal of biological chemistry* 278.27 (2003), S. 24608–24616. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M300036200](https://doi.org/10.1074/jbc.M300036200).
- [137] S. E. Jacobsen, K. A. Binkowski und N. E. Olszewski. "SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in Arabidopsis". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93.17 (1996), S. 9292–9296. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.93.17.9292](https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9292).
- [138] Mona D. Jensen, Margaret Conley und Lucy Dale Helstowski. "Culture of Plasmodium falciparum: The Role of pH, Glucose, and Lactate". In: *The Journal of Parasitology* 69.6 (1983), S. 1060. ISSN: 00223395. DOI: [10.2307/3280864](https://doi.org/10.2307/3280864).
- [139] Suena Ji, Jeong Gu Kang, Sang Yoon Park, Joohun Lee, Young J. Oh und Jin Won Cho. "O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization". In: *Amino acids* 40.3 (2011), S. 809–818. ISSN: 0939-4451. DOI: [10.1007/s00726-010-0698-9](https://doi.org/10.1007/s00726-010-0698-9).
- [140] Ramona Jochmann, Patrick Holz, Heinrich Sticht und Michael Sturzl. "Validation of the reliability of computational O-GlcNAc prediction". In: *Biochimica et biophysica acta* 1844.2 (2014), S. 416–421. ISSN: 0006-3002. DOI: [10.1016/j.bbapap.2013.12.002](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.002).
- [141] Paweł Józwiak, Ewa Forma, Magdalena Bryś und Anna Krześlak. "O-GlcNAcylation and Metabolic Reprogramming in Cancer". In: *Frontiers in Endocrinology* 5 (Sep. 2014). DOI: [10.3389/fendo.2014.00145](https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00145).
- [142] Barbara Kappes, Bernd W. Suetterlin, Renate Hofer-Warbinek, Rok Humar und Richard M. Franklin. "Two major phosphoproteins of Plasmodium falciparum are heat shock proteins". In: *Molecular and biochemical parasitology* 59.1 (1993), S. 83–94. ISSN: 0166-6851. DOI: [10.1016/0166-6851\(93\)90009-M](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90009-M).
- [143] Teodoro S. Kaufman und Edmundo A. Rúveda. "Die Jagd auf Chinin: Etappenerfolge und Gesamtsiege". In: *Angewandte Chemie* 117.6 (2005), S. 876–907. ISSN: 00448249. DOI: [10.1002/ange.200400663](https://doi.org/10.1002/ange.200400663).
- [144] M. H. Kayedi, H. Kaur, A. A. Haghdoost und J. D. Lines. "The effects of different drying methods and sun exposure on the concentrations of deltamethrin in nets treated with K-O Tab tablets". In: *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 103.1 (2009), S. 85–90. ISSN: 0003-4983. DOI: [10.1179/136485909X385018](https://doi.org/10.1179/136485909X385018).

- [145] M. H. Kayedi, J. D. Lines, A. A. Haghdoost, M. H. Vatandoost, Y. Rassi und K. Khamisabady. "Evaluation of the effects of repeated hand washing, sunlight, smoke and dirt on the persistence of deltamethrin on insecticide-treated nets". In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102.8 (2008), S. 811–816. ISSN: 00359203. DOI: [10.1016/j.trstmh.2008.05.025](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.05.025).
- [146] K. P. Kears und G. W. Hart. "Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins". In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88.5 (1991), S. 1701–1705. DOI: [10.1073/pnas.88.5.1701](https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1701).
- [147] W. G. Kelly und G. W. Hart. "Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin". In: *Cell* 57.2 (1989), S. 243–251. DOI: [10.1016/0092-8674\(89\)90962-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90962-8).
- [148] H. Kim, U. Certa, H. Dobeli, P. Jakob und W. G. Hol. "Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*". In: *Biochemistry* 37.13 (1998), S. 4388–4396. ISSN: 0006-2960. DOI: [10.1021/bi972233h](https://doi.org/10.1021/bi972233h).
- [149] Hoe Suk Kim, Eun Mi Kim, Jiae Lee, Won Ho Yang, Tae Yoon Park, Young Min Kim und Jin Won Cho. "Heat shock protein 60 modified with O-linked N-acetylglucosamine is involved in pancreatic beta-cell death under hyperglycemic conditions". In: *FEBS letters* 580.9 (2006), S. 2311–2316. ISSN: 0014-5793. DOI: [10.1016/j.febslet.2006.03.043](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.043).
- [150] Emilia A. Kimura, Alicia S. Couto, Valnice J. Peres, Olga L. Casal und Alejandro M. Katzin. "N-Linked Glycoproteins Are Related to Schizogony of the Intraerythrocytic Stage in *Plasmodium falciparum*". In: *Journal of Biological Chemistry* 271.24 (1996), S. 14452–14461. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.271.24.14452](https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14452).
- [151] Sasa Koncarevic, Petra Rohrbach, Marcel Deponte, Georg Krohne, Judith Helena Prieto, John Yates, Stefan Rahlfs und Katja Becker. "The malarial parasite *Plasmodium falciparum* imports the human protein peroxiredoxin 2 for peroxide detoxification". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.32 (2009), S. 13323–13328. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.0905387106](https://doi.org/10.1073/pnas.0905387106).
- [152] Kristine Krafts, Ernst Hempelmann und Agnieszka Skorska-Stania. "From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy". In: *Parasitology research* 111.1 (2012), S. 1–6. ISSN: 0932-0113. DOI: [10.1007/s00436-012-2886-x](https://doi.org/10.1007/s00436-012-2886-x).
- [153] L. K. Kreppel, M. A. Blomberg und G. W. Hart. "Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc Transferase with multiple tetratricopeptide repeats". In: *Journal*

- of Biological Chemistry* 272.14 (1997), S. 9308–9315. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.272.14.9308](https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9308).
- [154] L. K. Kreppel und G. W. Hart. "Regulation of a Cytosolic and Nuclear O-GlcNAc Transferase: Role of the tetratricopeptide repeats". In: *Journal of Biological Chemistry* 274.45 (1999), S. 32015–32022. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.274.45.32015](https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32015).
- [155] Mattis Kupferschmid, Moyira Osny Aquino Gil, Hosam Shams-Eldin, Jörg Schmidt, Nao Yamakawa, Frédéric Krzewinski, Ralph T. Schwarz und Tony Lefebvre. "Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*". In: *Malaria journal* 16.1 (2017), S. 485. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/s12936-017-2131-2](https://doi.org/10.1186/s12936-017-2131-2).
- [156] Boglarka Laczy, Susan A. Marsh, Charlye A. Brocks, Istvan Wittmann und John C. Chatham. "Inhibition of O-GlcNAcase in perfused rat hearts by NAG-thiazolines at the time of reperfusion is cardioprotective in an O-GlcNAc-dependent manner". In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299.5 (2010), H1715–27. DOI: [10.1152/ajpheart.00337.2010](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00337.2010).
- [157] U. K. Laemmli. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". In: *Nature* 227.5259 (1970), S. 680–685. DOI: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0).
- [158] John R. Lamb, Stuart Tugendreich und Phil Hieter. "Tetratricopeptide repeat interactions: To TPR or not to TPR?" In: *Trends in Biochemical Sciences* 20.7 (1995), S. 257–259. ISSN: 09680004. DOI: [10.1016/S0968-0004\(00\)89037-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89037-4).
- [159] Laveran, Charles Louis Alphonse. "Un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre - origine parasitaire des accidents de l'impaludisme: Communication faite à la Société médicale des hôpitaux dans la séance de 24 décembre 1880: Source gallica.bnf.fr / Bibliothèque nationale de France". In: *Bulletins et mémoires de la Société médicale des hôpitaux de Paris* T17.Ser2 (1880), S. 158–164.
- [160] Tony Lefebvre, Catherine Alonso, Saïd Mahboub, Marie-Joëlle Dupire, Jean-Pierre Zanetta, Marie-Laure Caillet-Boudin und Jean-Claude Michalski. "Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line". In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1472.1-2 (1999), S. 71–81. ISSN: 03044165. DOI: [10.1016/S0304-4165\(99\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00105-1).
- [161] Tony Lefebvre, Frederic Baert, Jean-Francois Bodart, Stephane Flament, Jean-Claude Michalski und Jean-Pierre Vilain. "Modulation of O-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation". In: *Journal of cellular biochemistry* 93.5 (2004), S. 999–1010. ISSN: 0730-2312. DOI: [10.1002/jcb.20242](https://doi.org/10.1002/jcb.20242).

- [162] Tony Lefebvre, Caroline Cieniewski, Jérôme Lemoine, Yann Guerardel, Yves Leroy, Jean-Pierre Zanetta und Jean-Claude Michalski. "Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins". In: *Biochemical Journal* 360.1 (2001), S. 179–188. ISSN: 0264-6021. DOI: [10.1042/bj3600179](https://doi.org/10.1042/bj3600179).
- [163] Maïté Leturcq, Tony Lefebvre und Anne-Sophie Vercoutter-Edouart. "O-GlcNAcylation and chromatin remodeling in mammals: an up-to-date overview". In: *Biochemical Society Transactions* 45.2 (Apr. 2017), S. 323–338. DOI: [10.1042/bst20160388](https://doi.org/10.1042/bst20160388).
- [164] Wei Lin, Ling Gao und Xing Chen. "Protein-specific imaging of posttranslational modifications". In: *Current opinion in chemical biology* 28 (2015), S. 156–163. ISSN: 1367-5931. DOI: [10.1016/j.cbpa.2015.07.020](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.07.020).
- [165] Caifei Liu und Jing Li. "O-GlcNAc: A Sweetheart of the Cell Cycle and DNA Damage Response". In: *Frontiers in endocrinology* 9 (2018), S. 415. ISSN: 1664-2392. DOI: [10.3389/fendo.2018.00415](https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00415).
- [166] S. Looareesuwan, T. M. Davis, S. Pukrittayakamee, W. Supanaranond, V. Desakorn, K. Silamut, S. Krishna, S. Boonamrung und N. J. White. "Erythrocyte survival in severe falciparum malaria". In: *Acta tropica* 48.4 (1991), S. 263–270. ISSN: 0001-706X. DOI: [10.1016/0001-706x\(91\)90014-b](https://doi.org/10.1016/0001-706x(91)90014-b).
- [167] D. C. Love, Jarema Kochran, R. Lamont Cathey, Sang-Hoon Shin und John A. Hanover. "Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase". In: *Journal of Cell Science* 116.4 (2002), S. 647–654. ISSN: 00219533. DOI: [10.1242/jcs.00246](https://doi.org/10.1242/jcs.00246).
- [168] Dona C. Love und John A. Hanover. "The hexosamine signaling pathway: deciphering the O-GlcNAc code". In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005.312 (2005), re13. ISSN: 1525-8882. DOI: [10.1126/stke.3122005re13](https://doi.org/10.1126/stke.3122005re13).
- [169] W. A. Lubas und John A. Hanover. "Functional Expression of O-linked GlcNAc Transferase. Domain Structure and Substrate Specificity". In: *Journal of Biological Chemistry* 275.15 (2000), S. 10983–10988. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.275.15.10983](https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10983).
- [170] William A. Lubas, David W. Frank, Michael Krause und John A. Hanover. "O-Linked GlcNAc Transferase Is a Conserved Nucleocytoplasmic Protein Containing Tetratricopeptide Repeats". In: *Journal of Biological Chemistry* 272.14 (1997), S. 9316–9324. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.272.14.9316](https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9316).
- [171] Junfeng Ma und Gerald W. Hart. "Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications". In: *Expert review of proteomics* 10.4 (2013), S. 365–380. ISSN: 1478-9450. DOI: [10.1586/14789450.2013.820536](https://doi.org/10.1586/14789450.2013.820536).

- [172] G. MacDonald und G. W. Goeckel. "The Malaria parasite rate and interruption of transmission". In: *Bulletin of the World Health Organization* 31 (1964), S. 365–377. ISSN: 0042-9686. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/267098>.
- [173] Cristiana S. de Macedo, Ralph T. Schwarz, Adriane R. Todeschini, Jose O. Previato und Lucia Mendonça-Previato. "Overlooked post-translational modifications of proteins in Plasmodium falciparum: N- and O-glycosylation – a review". In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105.8 (2010), S. 949–956. DOI: [10.1590/S0074-02762010000800001](https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000800001).
- [174] Kathryn Maitland und Kevin Marsh. "Pathophysiology of severe malaria in children". In: *Acta tropica* 90.2 (2004), S. 131–140. ISSN: 0001-706X. DOI: [10.1016/j.actatropica.2003.11.010](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.11.010).
- [175] Management Sciences for Health, Hrsg. *International Medical Products Price Guide: Chloroquine (Base) Specific Year: 2015*. 2015. URL: <http://mshpriceguide.org/en/single-drug-information/?DMFId=163&searchYear=2015> (besucht am 22. 02. 2019).
- [176] Liliana Mancio-Silva, Ksenija Slavic, Margarida T. Grilo Ruivo, Ana Rita Grosso, Katarzyna K. Modrzyńska, Iset Medina Vera, Joana Sales-Dias, Ana Rita Gomes, Cameron Ross MacPherson, Pierre Crozet, Mattia Adamo, Elena Baena-Gonzalez u. a. "Nutrient sensing modulates malaria parasite virulence". In: *Nature* 547.7662 (2017), S. 213–216. DOI: [10.1038/nature23009](https://doi.org/10.1038/nature23009).
- [177] Genesia Manganelli, Ugo Masullo, Stefania Passarelli und Stefania Filosa. "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: Disadvantages and Possible Benefits". In: *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets* 13.1 (2013), S. 73–82. ISSN: 1871529X. DOI: [10.2174/1871529X11313010008](https://doi.org/10.2174/1871529X11313010008).
- [178] K. Marsh und S. Kinyanjui. "Immune effector mechanisms in malaria". In: *Parasite immunology* 28.1-2 (2006), S. 51–60. ISSN: 0141-9838. DOI: [10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x).
- [179] Hassan Masum, Ronak Shah, Karl Schroeder, Abdallah S. Daar und Peter A. Singer. "Africa's largest long-lasting insecticide-treated net producer: lessons from A to Z Textiles". In: *BMC international health and human rights* 10 Suppl 1 (2010), S6. ISSN: 1472-698X. DOI: [10.1186/1472-698X-10-S1-S6](https://doi.org/10.1186/1472-698X-10-S1-S6).
- [180] Tonderayi S. Matambo, Odutayo O. Odunuga, Aileen Boshoff und Gregory L. Blatch. "Overproduction, purification, and characterization of the Plasmodium falciparum heat shock protein 70". In: *Protein Expression and Purification* 33.2 (2004), S. 214–222. ISSN: 10465928. DOI: [10.1016/j.pep.2003.09.010](https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.09.010).
- [181] Monika Mehta, Haripalsingh M. Sonawat und Shobhona Sharma. "Malaria parasite-infected erythrocytes inhibit glucose utilization in uninfected red cells". In: *FEBS letters* 579.27 (2005), S. 6151–6158. ISSN: 0014-5793. DOI: [10.1016/j.febslet.2005.09.088](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.088).

- [182] “Membrane knobs are required for the microcirculatory obstruction induced by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82.11 (1985), S. 3829–3833. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.82.11.3829](https://doi.org/10.1073/pnas.82.11.3829).
- [183] Kamini N. Mendis, Peter H. David und Richard Carter. “Antigenic polymorphism in malaria: Is it an important mechanism for immune evasion?” In: *Immunology Today* 12.3 (1991), A34–A37. ISSN: 01675699. DOI: [10.1016/S0167-5699\(05\)80010-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(05)80010-6).
- [184] M. M. Mota, G. Pradel, J. P. Vanderberg, J. C. Hafalla, U. Frevert, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig und A. Rodriguez. “Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection”. In: *Science (New York, N.Y.)* 291.5501 (2001), S. 141–144. ISSN: 0036-8075. DOI: [10.1126/science.291.5501.141](https://doi.org/10.1126/science.291.5501.141).
- [185] Christopher A. Moxon, Samuel C. Wassmer, Danny A. Milner JR, Ngawina V. Chisala, Terrie E. Taylor, Karl B. Seydel, Malcolm E. Molyneux, Brian Farragher, Charles T. Esmon, Colin Downey, Cheng-Hock Toh, Alister G. Craig u. a. “Loss of endothelial protein C receptors links coagulation and inflammation to parasite sequestration in cerebral malaria in African children”. In: *Blood* 122.5 (2013), S. 842–851. DOI: [10.1182/blood-2013-03-490219](https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-490219).
- [186] Ivo Mueller, Peter A. Zimmerman und John C. Reeder. “*Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*—the “bashful” malaria parasites”. In: *Trends in parasitology* 23.6 (2007), S. 278–283. ISSN: 1471-4922. DOI: [10.1016/j.pt.2007.04.009](https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.04.009).
- [187] Wiebke Nahrendorf, Anja Scholzen, Robert W. Sauerwein und Jean Langhorne. “Cross-stage immunity for malaria vaccine development”. In: *Vaccine* 33.52 (2015), S. 7513–7517. ISSN: 0264-410X. DOI: [10.1016/j.vaccine.2015.09.098](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.098).
- [188] K. M. Naumann, G. L. Jones, A. Saul und R. Smith. “Parasite-induced changes to localized erythrocyte membrane deformability in *Plasmodium falciparum* cultures”. In: *Immunology and cell biology* 70 (Pt 4) (1992), S. 267–275. ISSN: 0818-9641. DOI: [10.1038/icb.1992.34](https://doi.org/10.1038/icb.1992.34).
- [189] Sondra Maureen Nemetski, Timothy J. Cardozo, Gundula Bosch, Ryan Weltzer, Kevin O’Malley, Ijeoma Ejigiri, Kota Arun Kumar, Carlos A. Buscaglia, Victor Nussenzweig, Photini Sinnis, Jelena Levitskaya und Jurgen Bosch. “Inhibition by stabilization: targeting the *Plasmodium falciparum* aldolase-TRAP complex”. In: *Malaria journal* 14 (2015), S. 324. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/s12936-015-0834-9](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0834-9).
- [190] Andreas G. Nerlich, Bettina Schraut, Sabine Dittrich, Thomas Jelinek und Albert R. Zink. “*Plasmodium falciparum* in ancient Egypt”. In: *Emerging infectious diseases* 14.8 (2008), S. 1317–1319. ISSN: 1080-6040. DOI: [10.3201/eid1408.080235](https://doi.org/10.3201/eid1408.080235).

- [191] Nobel Media AB 2014. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015: William C. Campbell, Satoshi Ōmura, Youyou Tu". In: *Nobelprize.org* (Web. 2 Sep 2016). URL: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/.
- [192] Abdisalan M. Noor, Damaris K. Kinyoki, Clara W. Mundia, Caroline W. Kabaria, Jonesmus W. Mutua, Victor A. Alegana, Ibrahima Socé Fall und Robert W. Snow. "The changing risk of *Plasmodium falciparum* malaria infection in Africa: 2000–10: a spatial and temporal analysis of transmission intensity". In: *The Lancet* 383.9930 (2014), S. 1739–1747. ISSN: 01406736. DOI: [10.1016/S0140-6736\(13\)62566-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62566-0).
- [193] Fredros O. Okumu und Sarah J. Moore. "Combining indoor residual spraying and insecticide-treated nets for malaria control in Africa: a review of possible outcomes and an outline of suggestions for the future". In: *Malaria journal* 10.1 (2011), S. 208. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/1475-2875-10-208](https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-208).
- [194] P. Oliaro. "Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs". In: *Pharmacology & Therapeutics* 89.2 (2001), S. 207–219. ISSN: 01637258. DOI: [10.1016/S0163-7258\(00\)00115-7](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00115-7).
- [195] Maya A. Olshina, Fiona Angrisano, Danushka S. Marapana, David T. Riglar, Kartik Bane, Wilson Wong, Bruno Catimel, Meng-Xin Yin, Andrew B. Holmes, Friedrich Frischknecht, David R. Kovar und Jake Baum. "*Plasmodium falciparum* coronin organizes arrays of parallel actin filaments potentially guiding directional motility in invasive malaria parasites". In: *Malaria journal* 14 (2015), S. 280. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/s12936-015-0801-5](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0801-5).
- [196] E. Onori und B. Grab. "Indicators for the forecasting of malaria epidemics". In: *Bull. World Health Organ.* 58.1 (1980), 91–98, PMID: 6966545; PMCID: PMC2395888.
- [197] Ipsata Pal-Bhowmick, Nirbhay Kumar, Shobhona Sharma, Isabelle Coppens und Gotam K. Jarori. "*Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization". In: *Malaria journal* 8 (2009), S. 179. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/1475-2875-8-179](https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-179).
- [198] Richard E.L. Paul, Paul T. Brey und Vincent Robert. "*Plasmodium* sex determination and transmission to mosquitoes". In: *Trends in parasitology* 18.1 (2002), S. 32–38. ISSN: 1471-4922. DOI: [10.1016/S1471-4922\(01\)02122-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02122-5).
- [199] Soumen Paul, Mohammad B. Haskali, Jeih-San Liow, Sami S. Zoghbi, Vanessa N. Barth, Marcy Comly Kolodrubetz, Michelle R. Bond, Cheryl L. Morse, Robert L. Gladding, Michael P. Frankland, Nancy Kant, Lawrence Sliker u. a. "Evaluation of a PET Radioligand to Image O-GlcNAcase in Brain and Periphery of Rhesus Monkey and Knock-Out Mouse". In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 60.1 (2019), S. 129–134. DOI: [10.2967/jnumed.118.213231](https://doi.org/10.2967/jnumed.118.213231).

- [200] Pierre Joseph Pelletier und Joseph-Bienaimé Caventou. *Analyse chimique des Quinquina: suivie d'observations médicales sur l'emploi de la quinine et de la cinchonine*. Paris: L. Colas Fils, 1821. ISBN: 978-2329354057.
- [201] Yobana Perez-Cervera, Gregoire Harichaux, Jörg Schmidt, Francoise Debierre-Grockiego, Vanessa Dehennaut, Ulrike Bieker, Edwige Meurice, Tony Lefebvre und Ralph T. Schwarz. "Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study". In: *Amino acids* 40.3 (2011), S. 847–856. ISSN: 0939-4451. DOI: [10.1007/s00726-010-0702-4](https://doi.org/10.1007/s00726-010-0702-4).
- [202] Jennifer Pinder, Ruth Fowler, Lawrence Bannister, Anton Dluzewski und Graham Mitchell. "Motile Systems in Malaria Merozoites: How is the Red Blood Cell Invaded?" In: *Parasitology Today* 16.6 (2000), S. 240–245. ISSN: 01694758. DOI: [10.1016/S0169-4758\(00\)01664-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01664-1).
- [203] T. Ponnudurai, A.H.W. Lensen, G.J.A. van Gemert, M. G. Bolmer und J.H.E.Th. Meuwissen. "Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected *Anopheles stephensi*". In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85.2 (1991), S. 175–180. ISSN: 00359203. DOI: [10.1016/0035-9203\(91\)90012-N](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90012-N).
- [204] Silvia Portugal, Christopher M. Tipton, Haewon Sohn, Younoussou Kone, Jing Wang, Shanping Li, Jeff Skinner, Kimmo Virtaneva, Daniel E. Sturdevant, Stephen F. Porcella, Ogobara K. Doumbo, Safiatou Doumbo u. a. "Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function". In: *eLife* 4 (2015). ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/eLife.07218](https://doi.org/10.7554/eLife.07218).
- [205] R. N. Price, J. A. Simpson, F. Nosten, C. Luxemburger, L. Hkirjaroen, Kuile F. ter, T. Chongsuphajaisiddhi und N. J. White. "Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria". In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65.5 (Nov. 2001), S. 614–622. DOI: [10.4269/ajtmh.2001.65.614](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.614).
- [206] Ric N. Price, Lorenz von Seidlein, Neena Valecha, Francois Nosten, J. Kevin Baird und Nicholas J. White. "Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: A systematic review and meta-analysis". In: *The Lancet Infectious Diseases* 14.10 (2014), S. 982–991. ISSN: 14733099. DOI: [10.1016/S1473-3099\(14\)70855-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70855-2).
- [207] Stuart A. Ralph und Artur Scherf. "The epigenetic control of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*". In: *Current Opinion in Microbiology* 8.4 (2005), S. 434–440. ISSN: 1369-5274. DOI: [10.1016/j.mib.2005.06.007](https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.007).

- [208] Neela D. S. Rambaruth, Pamela Greenwell und Miriam V. Dwek. "The lectin *Helix pomatia* agglutinin recognizes O-GlcNAc containing glycoproteins in human breast cancer". In: *Glycobiology* 22.6 (2012), S. 839–848. ISSN: 0959-6658. DOI: [10.1093/glycob/cws051](https://doi.org/10.1093/glycob/cws051).
- [209] Redaktionsbeitrag. "ZNS-toxisches Mefloquin (Lariam) als Malariamittel noch zu rechtfertigen?" In: *arznei-telegramm* 44.8 (2013), S. 72. URL: <http://www.arznei-telegramm.de/register/F6625VC.pdf>.
- [210] Russell A. Reeves, Albert Lee, Roger Henry und Natasha E. Zachara. "Characterization of the specificity of O-GlcNAc reactive antibodies under conditions of starvation and stress". In: *Analytical biochemistry* 457 (2014), S. 8–18. DOI: [10.1016/j.ab.2014.04.008](https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.008).
- [211] Khalid Rehman, Felix Lotsch, Peter G. Kremsner und Michael Ramharter. "Haemolysis associated with the treatment of malaria with artemisinin derivatives: a systematic review of current evidence". In: *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 29 (2014), S. 268–273. ISSN: 1201-9712. DOI: [10.1016/j.ijid.2014.09.007](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.09.007).
- [212] Clotilde Ribaut, Antoine Berry, Severine Chevalley, Karine Reybier, Isabelle Morlais, Daniel Parzy, Françoise Nepveu, Françoise Benoit-Vical und Alexis Valentin. "Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species". In: *Malaria journal* 7 (2008), S. 45. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/1475-2875-7-45](https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-45).
- [213] Markus Ritzefeld, Megan H. Wright und Edward W. Tate. "New developments in probing and targeting protein acylation in malaria, leishmaniasis and African sleeping sickness". In: *Parasitology* 145.2 (2018), S. 157–174. ISSN: 0031-1820. DOI: [10.1017/S0031182017000282](https://doi.org/10.1017/S0031182017000282).
- [214] Robert-Koch-Institut. "Malaria: RKI-Ratgeber fuer Aerzte". In: *RKI-Ratgeber* (2015). URL: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html.
- [215] Mark D. Roos und John A. Hanover. "Structure of O-Linked GlcNAc Transferase: Mediator of Glycan-Dependent Signaling". In: *Biochemical and biophysical research communications* 271.2 (2000), S. 275–280. ISSN: 0006-291X. DOI: [10.1006/bbrc.2000.2600](https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2600).
- [216] E. P. Roquemore, M. R. Chevrier, R. J. Cotter und G. W. Hart. "Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin". In: *Biochemistry* 35.11 (1996), S. 3578–3586. ISSN: 0006-2960. DOI: [10.1021/bi951918j](https://doi.org/10.1021/bi951918j).
- [217] Ronald Ross. "On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood". In: *The British Medical Journal* 2.1929 (1897), S. 1786–1788. DOI: [10.1580/1080-6032\(1999\)010\[0029:OSPPCF\]2.3.CO;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(1999)010[0029:OSPPCF]2.3.CO;2).

- [218] E. F. Roth JR. "Plasmodium falciparum carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite". In: *Blood cells* 16.2-3 (1990), 453–60; discussion 461–6, PMID: 2257322. ISSN: 0340-4684.
- [219] E. F. Roth JR, M. C. Calvin, I. Max-Audit, J. Rosa und R. Rosa. "The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with Plasmodium falciparum malaria parasites". In: *Blood* 72.6 (1988), S. 1922–1925. DOI: [10.1182/blood.V72.6.1922.1922](https://doi.org/10.1182/blood.V72.6.1922.1922).
- [220] E. F. Roth JR, V. Joulin, S. Miwa, A. Yoshida, J. Akatsuka, M. Cohen-Solal und R. Rosa. "The use of enzymopathic human red cells in the study of malarial parasite glucose metabolism". In: *Blood* 71.5 (1988), S. 1408–1413. URL: [10.1182/blood.V71.5.1408.1408](https://doi.org/10.1182/blood.V71.5.1408.1408).
- [221] J. Alexandra Rowe, Antoine Claessens, Ruth A. Corrigan und Monica Arman. "Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications". In: *Expert reviews in molecular medicine* 11 (2009), e16. ISSN: 1462-3994. DOI: [10.1017/S1462399409001082](https://doi.org/10.1017/S1462399409001082).
- [222] Michael A. Ruggiero, Dennis P. Gordon, Thomas M. Orrell, Nicolas Bailly, Thierry Bourgoïn, Richard C. Brusca, Thomas Cavalier-Smith, Michael D. Guiry und Paul M. Kirk. "A higher level classification of all living organisms". In: *PloS one* 10.4 (2015), e0119248. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0119248](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248).
- [223] Jeffrey Sachs und Pia Malaney. "The economic and social burden of malaria". In: *Nature* 415.6872 (2002), S. 680–685. DOI: [10.1038/415680a](https://doi.org/10.1038/415680a).
- [224] Innocent Safeukui, Noe D. Gomez, Aanuoluwa A. Adelani, Florence Burte, Nathaniel K. Afolabi, Rama Akondy, Peter Velazquez, Anthony Holder, Rita Tewari, Pierre Buffet, Biobele J. Brown, Wuraola A. Shokunbi u. a. "Malaria induces anemia through CD8+ T cell-dependent parasite clearance and erythrocyte removal in the spleen". In: *mBio* 6.1 (2015). ISSN: 2150-7511. DOI: [10.1128/mBio.02493-14](https://doi.org/10.1128/mBio.02493-14).
- [225] Praveen K. Sahu, Sanghamitra Satpathi, Prativa K. Behera, Saroj K. Mishra, Sanjib Mohanty und Samuel Crocodile Wassmer. "Pathogenesis of cerebral malaria: new diagnostic tools, biomarkers, and therapeutic approaches". In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 5 (2015), S. 75. ISSN: 2235-2988. DOI: [10.3389/fcimb.2015.00075](https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00075).
- [226] Onyango Sangoro, Elizabeth Turner, Emmanuel Simfukwe, Jane E. Miller und Sarah J. Moore. "A cluster-randomized controlled trial to assess the effectiveness of using 15% DEET topical repellent with long-lasting insecticidal nets (LLINs) compared to a placebo lotion on malaria transmission". In: *Malaria journal* 13 (2014), S. 324. ISSN: 1475-2875. DOI: [10.1186/1475-2875-13-324](https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-324).

- [227] J. M. Scamardella. "Not plants or animals: A brief history of the origin of Kingdoms Protozoa, Protista and Protoctista". In: *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 2.4 (1999), S. 207–216. ISSN: 1139-6709. DOI: [10.2436/im.v2i4.9219](https://doi.org/10.2436/im.v2i4.9219).
- [228] M. Schirm, M. Kalmokoff, A. Aubry, P. Thibault, M. Sandoz und S. M. Logan. "Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine". In: *Journal of bacteriology* 186.20 (2004), S. 6721–6727. ISSN: 0021-9193. DOI: [10.1128/JB.186.20.6721-6727.2004](https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6721-6727.2004).
- [229] Erwin D. Schleicher und Cora Weigert. "Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy". In: *Kidney International* 58 (2000), S13–S18. ISSN: 00852538. DOI: [10.1046/j.1523-1755.2000.07703.x](https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.07703.x).
- [230] Louis Schofield, Michael C. Hewitt, Krystal Evans, Mary-Anne Siomos und Peter H. Seeberger. "Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria". In: *Nature* 418.6899 (2002), S. 785–789. DOI: [10.1038/nature00937](https://doi.org/10.1038/nature00937).
- [231] G. D. Shanks. "How World War 1 changed global attitudes to war and infectious diseases". In: *Lancet (London, England)* 384.9955 (2014), S. 1699–1707. ISSN: 0140-6736. DOI: [10.1016/S0140-6736\(14\)61786-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61786-4).
- [232] Shweta Sharma, Mohit Jadli, Anu Singh, Kavita Arora und Pawan Malhotra. "A secretory multifunctional serine protease, DegP of *Plasmodium falciparum*, plays an important role in thermo-oxidative stress, parasite growth and development". In: *The FEBS journal* 281.6 (2014), S. 1679–1699. ISSN: 1742-464X. DOI: [10.1111/febs.12732](https://doi.org/10.1111/febs.12732).
- [233] Y. D. Sharma. "Knob proteins in *falciparum* malaria". In: *The Indian journal of medical research* 106 (1997), 53–62, PMID: 9291676. ISSN: 0971-5916.
- [234] Bang Shen und L. David Sibley. "Toxoplasma aldolase is required for metabolism but dispensable for host-cell invasion". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111.9 (2014), S. 3567–3572. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1315156111](https://doi.org/10.1073/pnas.1315156111).
- [235] Emma S. Sherling, Ellen Knuepfer, Joseph A. Brzostowski, Louis H. Miller, Michael J. Blackman und Christiaan van Ooij. "The *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake". In: *eLife* 6 (2017). ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/eLife.23239](https://doi.org/10.7554/eLife.23239).
- [236] Wei-Wei Shi, Yong-Liang Jiang, Fan Zhu, Yi-Hu Yang, Qiu-Yan Shao, Hong-Bo Yang, Yan-Min Ren, Hui Wu, Yuxing Chen und Cong-Zhao Zhou. "Structure of a novel O-linked N-acetyl-D-glucosamine (O-GlcNAc) transferase, GtfA, reveals insights into the glycosylation of pneumococcal serine-rich repeat adhesins". In: *The Journal of biological chemistry* 289.30 (2014), S. 20898–20907. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M114.581934](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581934).

- [237] Addmore Shonhai, Aileen Boshoff und Gregory L. Blatch. "The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*". In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 16.9 (2007), S. 1803–1818. ISSN: 0961-8368. DOI: [10.1110/ps.072918107](https://doi.org/10.1110/ps.072918107).
- [238] F. Silvestrini, P. Alano und J. L. Williams. "Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*". In: *Parasitology* 121 Pt 5 (2000), S. 465–471. ISSN: 0031-1820. DOI: [10.1017/S0031182099006691](https://doi.org/10.1017/S0031182099006691).
- [239] R. E. Sinden. "Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors". In: *Cellular microbiology* 4.11 (2002), S. 713–724. ISSN: 1462-5814. DOI: [10.1046/j.1462-5822.2002.00229.x](https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00229.x).
- [240] Balbir Singh und Cyrus Daneshvar. "Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*". In: *Clinical microbiology reviews* 26.2 (2013), S. 165–184. ISSN: 0893-8512. DOI: [10.1128/CMR.00079-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00079-12).
- [241] Balbir Singh, Lee Kim Sung, Asmad Matusop, Anand Radhakrishnan, Sunita S. G. Shamsul, Janet Cox-Singh, Alan Thomas und David J. Conway. "A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings". In: *The Lancet* 363.9414 (2004), S. 1017–1024. ISSN: 01406736. DOI: [10.1016/S0140-6736\(04\)15836-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15836-4).
- [242] H. Singh, R. Sen, S. Singh, S. B. Siwach, Jagdish und R. M. Singh. "Utility of intradermal smear in the diagnosis of malaria". In: *Tropical doctor* 33.2 (2003), S. 108–110. ISSN: 0049-4755. DOI: [10.1177/004947550303300220](https://doi.org/10.1177/004947550303300220).
- [243] Marianne E. Sinka. "Global Distribution of the Dominant Vector Species of Malaria". In: *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Hrsg. von Sylvie Manguin. InTech, 2013. ISBN: 978-953-51-1188-7. DOI: [10.5772/54163](https://doi.org/10.5772/54163).
- [244] Vincent Sluydts, Lies Durnez, Somony Heng, Charlotte Gryseels, Lydie Carnier, Saorin Kim, Karel van Roey, Karen Kerkhof, Nimol Khim, Sokny Mao, Sambunny Uk, Siv Sovannaroth u. a. "Efficacy of topical mosquito repellent (picaridin) plus long-lasting insecticidal nets versus long-lasting insecticidal nets alone for control of malaria: A cluster randomised controlled trial". In: *The Lancet Infectious Diseases* (2016). ISSN: 14733099. DOI: [10.1016/S1473-3099\(16\)30148-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30148-7).
- [245] Ryan C. Smith, Joel Vega-Rodríguez und Marcelo Jacobs-Lorena. "The *Plasmodium* bottleneck: Malaria parasite losses in the mosquito vector". In: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109.5 (2014), S. 644–661. ISSN: 0074-0276. DOI: [10.1590/0074-0276130597](https://doi.org/10.1590/0074-0276130597).
- [246] T. Smith, J. D. Charlwood, A. Y. Kitua, H. Masanja, S. Mwankusye, P. L. Alonso und M. Tanner. "Relationships of malaria morbidity with exposure to *Plasmodium falciparum* in young children in a highly endemic area". In:

- Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59.2 (1998), S. 252–257. DOI: [10.4269/ajtmh.1998.59.252](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.252).
- [247] Francisco Sánchez-Bayo und Kris A.G. Wyckhuys. “Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers”. In: *Biological Conservation* 232 (2019), S. 8–27. ISSN: 00063207. DOI: [10.1016/j.biocon.2019.01.020](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020).
- [248] G. Snounou, S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, Rosario V. E. do, S. Thaithong und K. N. Brown. “High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction”. In: *Molecular and biochemical parasitology* 61.2 (1993), S. 315–320. ISSN: 0166-6851. DOI: [10.1016/0166-6851\(93\)90077-B](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90077-B).
- [249] C. M. Snow, A. Senior und L. Gerace. “Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins”. In: *J. Cell Biol.* 104.5 (1987), S. 1143–1156. DOI: [10.1083/jcb.104.5.1143](https://doi.org/10.1083/jcb.104.5.1143).
- [250] Dominique Soldati, Bernardo J. Foth und Alan F. Cowman. “Molecular and functional aspects of parasite invasion”. In: *Trends in parasitology* 20.12 (2004), S. 567–574. ISSN: 1471-4922. DOI: [10.1016/j.pt.2004.09.009](https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.09.009).
- [251] Masha Somi, James Butler, Farshid Vahid, Joseph njau, S. Patrick Kachur und Salim Abdulla. “Is There Evidence for Dual Causation Between Malaria and Socioeconomic Status? Findings from Rural Tanzania”. In: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77.6 (2007), S. 1020–1027. URL: <http://hdl.handle.net/1885/24511>.
- [252] Pamela Stanley und Richard D. Cummings. *Essentials of Glycobiology: Structures Common to Different Glycans*. 2nd. Cold Spring Harbor (NY), 2009. ISBN: 9780879697709. DOI: [10.1101/glycobiology.3e.014](https://doi.org/10.1101/glycobiology.3e.014).
- [253] Pamela Stanley, Naoyuki Taniguchi und Markus Aepli. *Essentials of Glycobiology: N-Glycans*. 3rd. Cold Spring Harbor (NY), 2015. DOI: [10.1101/glycobiology.3e.009](https://doi.org/10.1101/glycobiology.3e.009).
- [254] B. Striepen, C. F. Zinecker, J. B. Damm, P. A. Melgers, G. J. Gerwig, M. Koolen, J. F. Vliegenthart, J. F. Dubremetz und R. T. Schwarz. “Molecular structure of the “low molecular weight antigen of *Toxoplasma gondii*: A glucose alpha 1-4 N-acetylgalactosamine makes free glycosyl-phosphatidylinositols highly immunogenic”. In: *Journal of molecular biology* 266.4 (1997), S. 797–813. ISSN: 0022-2836. DOI: [10.1006/jmbi.1996.0806](https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0806).
- [255] S. M. Swain, T. S. Tseng und N. E. Olszewski. “Altered expression of SPINDLY affects gibberellin response and plant development”. In: *Plant Physiol* 126.3 (2001), S. 1174–1185. DOI: [10.1104/pp.126.3.1174](https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1174).
- [256] Kristian E. Swearingen und Scott E. Lindner. “Plasmodium Parasites Viewed through Proteomics”. In: *Trends in parasitology* 34.11 (2018), S. 945–960. ISSN: 1471-4922. DOI: [10.1016/j.pt.2018.08.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.08.003).

- [257] John E. P. Syka, Joshua J. Coon, Melanie J. Schroeder, Jeffrey Shabanowitz und Donald F. Hunt. "Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.26 (2004), S. 9528–9533. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.0402700101](https://doi.org/10.1073/pnas.0402700101).
- [258] Ee Phie Tan, Francesca E. Duncan und Chad Slawson. "The sweet side of the cell cycle". In: *Biochemical Society transactions* 45.2 (2017), S. 313–322. DOI: [10.1042/BST20160145](https://doi.org/10.1042/BST20160145).
- [259] Tamara Taraciuk Broner. *The Global Fund Should Move Boldly to Help Venezuelans*. Hrsg. von Caracas Chronicles. 8.05.2018. URL: <https://www.hrw.org/news/2018/05/08/global-fund-should-move-boldly-help-venezuelans> (besucht am 15. 12. 2018).
- [260] Isabelle Tardieux, Ivan Baines, Malgorzata Mossakowska und Gary E. Ward. "Actin-binding proteins of invasive malaria parasites and the regulation of actin polymerization by a complex of 32/34-kDa proteins associated with heat shock protein 70kDa". In: *Molecular and biochemical parasitology* 93.2 (1998), S. 295–308. ISSN: 0166-6851. DOI: [10.1016/S0166-6851\(98\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00044-9).
- [261] W. Robert J. Taylor und Nicholas J. White. "Antimalarial Drug Toxicity". In: *Drug Safety* 27.1 (2004), S. 25–61. ISSN: 0114-5916. DOI: [10.2165/00002018-200427010-00003](https://doi.org/10.2165/00002018-200427010-00003).
- [262] Thomas J. Templeton, Lakshminarayan M. Iyer, Vivek Anantharaman, Shini-chiro Enomoto, Juan E. Abrahante, G. M. Subramanian, Stephen L. Hoffman, Mitchell S. Abrahamsen und L. Aravind. "Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes". In: *Genome research* 14.9 (2004), S. 1686–1695. ISSN: 1088-9051. DOI: [10.1101/gr.2615304](https://doi.org/10.1101/gr.2615304).
- [263] The Secretariat of the Stockholm Convention. "The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs): as amended in 2009: Text and Annexes". In: (2010). URL: <http://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-COP-CONVTEXT-2009.En.pdf> (besucht am 22. 02. 2019).
- [264] S. Thumasupapong, T. Tin, K. Sukontason, C. Sawaddichi und J. Karbwang. "Electroencephalography in cerebral malaria". In: *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 26.1 (1995), 34–37, PMID: 8525417. ISSN: 0125-1562.
- [265] Erick T. Tjhin, Henry M. Staines, Donnelly A. van Schalkwyk, Sanjeev Krishna und Kevin J. Saliba. "Studies with the Plasmodium falciparum hexokinase reveal that PfHT limits the rate of glucose entry into glycolysis". In: *FEBS letters* 587.19 (2013), S. 3182–3187. ISSN: 0014-5793. DOI: [10.1016/j.febslet.2013.07.052](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.052).

- [266] C. R. Torres und G. W. Hart. "Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc". In: *J. Biol. Chem.* 259.5 (1984), S. 3308–3317. DOI: [0.1016/S0021-9258\(17\)43295-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43295-9).
- [267] H. Towbin, T. Staehelin und J. Gordon. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76.9 (1979), S. 4350–4354. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.76.9.4350](https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350).
- [268] W. Trager und J. Jensen. "Human malaria parasites in continuous culture". In: *Science* 193.4254 (1976), S. 673–675. ISSN: 0036-8075. DOI: [10.1126/science.781840](https://doi.org/10.1126/science.781840).
- [269] Youyou Tu. "The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine". In: *Nature medicine* 17.10 (2011), S. 1217–1220. ISSN: 1078-8956. DOI: [10.1038/nm.2471](https://doi.org/10.1038/nm.2471).
- [270] V. Turusov, V. Rakitsky und L. Tomatis. "Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks". In: *Environmental Health Perspectives* 110.2 (2002), S. 125–128. ISSN: 0091-6765. DOI: [10.1289/ehp.02110125](https://doi.org/10.1289/ehp.02110125).
- [271] Lucy S. Tusting, Teun Bousema, David L. Smith und Chris Drakeley. "Measuring changes in Plasmodium falciparum transmission: precision, accuracy and costs of metrics". In: *Advances in parasitology* 84 (2014), S. 151–208. ISSN: 0065-308X. DOI: [10.1016/B978-0-12-800099-1.00003-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800099-1.00003-X).
- [272] Ariane Tyberghein, Katrien Deroost, Evelin Schwarzer, Paolo Arese und Philippe E. van den Steen. "Immunopathological effects of malaria pigment or hemozoin and other crystals". In: *BioFactors (Oxford, England)* 40.1 (2014), S. 59–78. ISSN: 0951-6433. DOI: [10.1002/biof.1119](https://doi.org/10.1002/biof.1119).
- [273] United States Centers for Disease Control and Prevention. *The microscopic diagnosis of Malaria: CD-Rom*. 2009.
- [274] Britta C. Urban und Stephen Todryk. "Malaria pigment paralyzes dendritic cells". In: *Journal of biology* 5.2 (2006), S. 4. ISSN: 1475-4924. DOI: [10.1186/jbio137](https://doi.org/10.1186/jbio137).
- [275] Ajit Varki, Hrsg. *Essentials of glycobiology*. 2. ed. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. ISBN: 978-0-87969-770-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908>.
- [276] Joel Vega-Rodriguez, Anil K. Ghosh, Stefan M. Kanzok, Rhoel R. Dinglasan, Sibao Wang, Nicholas J. Bongio, Dario E. Kalume, Kazutoyo Miura, Carole A. Long, Akhilesh Pandey und Marcelo Jacobs-Lorena. "Multiple pathways for Plasmodium ookinete invasion of the mosquito midgut". In: *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America 111.4 (2014), E492–500. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1315517111](https://doi.org/10.1073/pnas.1315517111).
- [277] Vereinte Nationen Generalversammlung. 55/2. *Millenniums-Erklärung der Vereinten Nationen: A/RES/55/2*. 2000-09-13. URL: <https://documents-dds-ny.un.org/doc/UNDOC/GEN/N02/000/02/pdf/N0200002.pdf?OpenElement> (besucht am 19. 05. 2018).
- [278] Vereinte Nationen Generalversammlung. *Transformation unserer Welt: die Agenda 2030 für nachhaltige Entwicklung: A/70/L.1*. 2015-09-18. URL: <https://documents-dds-ny.un.org/doc/UNDOC/GEN/N15/291/74/pdf/N1529174.pdf?OpenElement> (besucht am 19. 05. 2018).
- [279] Gretchen Vogel. “Malaria as lifesaving therapy”. In: *Science (New York, N.Y.)* 342.6159 (2013), S. 686. ISSN: 0036-8075. DOI: [10.1126/science.342.6159.686](https://doi.org/10.1126/science.342.6159.686).
- [280] Ioanna Voulgaridi, Theocharis Koufakis, Evdokia Ntava, Nikolaos Zisis und Maria Tsiakalou. “Malaria diagnosis: still a challenge in non-endemic countries”. In: *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 20.4 (2016), S. 410–411. ISSN: 1413-8670. DOI: [10.1016/j.bjid.2016.05.002](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.05.002).
- [281] Thomas Gregor Wagner. *Die Seuchen der Kreuzzüge: Krankheit und Krankenpflege auf den bewaffneten Pilgerfahrten ins Heilige Land: Zugl.: Würzburg, Univ., Diss. Bd. 7. Würzburger medizinhistorische Forschungen : Beiheft*. Würzburg: Königshausen & Neumann, 2009. ISBN: 978-3-8260-4073-3.
- [282] Xiaohai Wang, Karen Smith, Michelle Pearson, Anna Hughes, Mali L. Cosden, Jacob Marcus, J. Fred Hess, Mary J. Savage, Thomas Rosahl, Sean M. Smith, Joel B. Schachter und Jason M. Uslaner. “Early intervention of tau pathology prevents behavioral changes in the rTg4510 mouse model of tauopathy”. In: *PloS one* 13.4 (2018), e0195486. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0195486](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195486).
- [283] Yi-Xiang J. Wang und Fan Xiao. “Top five medical innovations in China mainland since Xinhai revolution 1911: results of AME survey-002”. In: *Quantitative imaging in medicine and surgery* 5.3 (2015), S. 453–466. ISSN: 2223-4306. DOI: [10.3978/j.issn.2223-4292.2015.03.10](https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2015.03.10).
- [284] Z. Wang, K. Park, F. Comer, L. C. Hsieh-Wilson, C. D. Saudek und G. W. Hart. “Site-specific GlcNAcylation of human erythrocyte proteins: potential biomarker(s) for diabetes”. In: *Diabetes* 58.2 (2009), S. 309–317. DOI: [10.2337/db08-0994](https://doi.org/10.2337/db08-0994).
- [285] Willayat Y. Wani, John C. Chatham, Victor Darley-USmar, Lori L. McMahon und Jianhua Zhang. “O-GlcNAcylation and neurodegeneration”. In: *Brain Research Bulletin* 133 (Juli 2017), S. 80–87. DOI: [10.1016/j.brainresbull.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.002).

- [286] Samuel C. Wassmer, Terrie E. Taylor, Pradipsinh K. Rathod, Saroj K. Mishra, Sanjib Mohanty, Myriam Arevalo-Herrera, Manoj T. Duraisingh und Joseph D. Smith. "Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach". In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 93.3 Suppl (2015), S. 42–56. ISSN: 0002-9637. DOI: [10.4269/ajtmh.14-0841](https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0841).
- [287] David J. Weatherall. "The definition and epidemiology of non-transfusion-dependent thalassemia". In: *Blood Reviews* 26 (2012), S3–S6. ISSN: 0268960X. DOI: [10.1016/S0268-960X\(12\)70003-6](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(12)70003-6).
- [288] T. E. Wellems und C. V. Plowe. "Chloroquine-resistant malaria". In: *The Journal of infectious diseases* 184.6 (2001), S. 770–776. ISSN: 0022-1899. DOI: [10.1086/322858](https://doi.org/10.1086/322858).
- [289] L. Wells. "Mapping Sites of O-GlcNAc Modification Using Affinity Tags for Serine and Threonine Post-translational Modifications". In: *Molecular & Cellular Proteomics* 1.10 (2002), S. 791–804. ISSN: 15359476. DOI: [10.1074/mcp.M200048-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.M200048-MCP200).
- [290] Stephen A. Whelan und Gerald W. Hart. "Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation". In: *Circulation research* 93.11 (2003), S. 1047–1058. ISSN: 0009-7330. DOI: [10.1161/01.RES.0000103190.20260.37](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000103190.20260.37).
- [291] Nicholas J. White, Tran T. Hien und Francois H. Nosten. "A Brief History of Qinghaosu". In: *Trends in parasitology* 31.12 (2015), S. 607–610. ISSN: 1471-4922. DOI: [10.1016/j.pt.2015.10.010](https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.10.010).
- [292] Mark E. Wickham, Janetta G. Culvenor und Alan F. Cowman. "Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte". In: *The Journal of biological chemistry* 278.39 (2003), S. 37658–37663. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M305252200](https://doi.org/10.1074/jbc.M305252200).
- [293] World Health Organization. *DDT and its derivatives - environmental aspects*. Bd. 83. Environmental health criteria. Geneva: World Health Organization, 1989. ISBN: 92-4-154283-7. URL: <http://hdl.handle.net/20.500.11822/29398> (besucht am 03. 03. 2021).
- [294] World Health Organization. *The Abuja Declaration and the plan of action. An extract from the African Summit on Roll Back Malaria 25 April 2000*. Geneva, 2003. URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_RBM_2003.46.pdf?ua=1 (besucht am 03. 03. 2021).
- [295] World Health Organization. *Indoor residual spraying: Use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination : WHO position statement*. Hrsg. von World Health Organization. 2006. URL: http://www.who.int/iris/bitstream/10665/69386/1/WHO_HTM_MAL_2006.1112_eng.pdf (besucht am 03. 03. 2021).

- [296] World Health Organization. *Basic malaria microscopy: Part I. Learner's Guide*. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 2010. ISBN: 9789241547826. URL: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241547820/en> (besucht am 03. 03. 2021).
- [297] World Health Organization. *Good practices for selecting and procuring rapid diagnostic tests for malaria*. Geneva: World Health Organization, 2011. ISBN: 978 92 4 150112 5. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/445301> (besucht am 03. 03. 2021).
- [298] World Health Organization. *Management of Severe Malaria: A Practical Handbook*. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2012. ISBN: 978 92 4 154852 6. URL: <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1218683> (besucht am 03. 03. 2021).
- [299] World Health Organization. *Guidelines for the treatment of malaria*. Third edition. Geneva: World Health Organization, 2015. ISBN: 9789241549127. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y (besucht am 03. 03. 2021).
- [300] World Health Organization. *World Malaria Report 2015*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2015. ISBN: 9241565152. URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/200018/9789241565158_eng.pdf?sequence=1 (besucht am 03. 03. 2021).
- [301] World Health Organization. *Malaria threat map: Vector insecticide resistance*. 2017. URL: <http://apps.who.int/malaria/maps/threats/> (besucht am 03. 03. 2021).
- [302] World Health Organization. *World malaria report 2017*. Geneva, 2017. ISBN: 9241565527. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1> (besucht am 03. 03. 2021).
- [303] World Health Organization. *World malaria report 2018*. Geneva, 2018. ISBN: 9789241565653. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf> (besucht am 03. 03. 2021).
- [304] World Health Organization. *World malaria report 2020*. Geneva, 2018. ISBN: 9789240015791. URL: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1321872/retrieve> (besucht am 03. 03. 2021).
- [305] Shou-Ling Xu, Robert J. Chalkley, Jason C. Maynard, Wenfei Wang, Weimin Ni, Xiaoyue Jiang, Kihye Shin, Ling Cheng, Dasha Savage, Andreas F. R. Hühmer, Alma L. Burlingame und Zhi-Yong Wang. "Proteomic analysis reveals O-GlcNAc modification on proteins with key regulatory functions in Arabidopsis". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114.8 (2017), E1536–E1543. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1610452114](https://doi.org/10.1073/pnas.1610452114).

- [306] Rama R. Yakubu, Louis M. Weiss und Natalie C. Silmon de Monerri. "Post-translational modifications as key regulators of apicomplexan biology: Insights from proteome-wide studies". In: *Molecular Microbiology* 107.1 (2018), S. 1–23. ISSN: 0950382X. DOI: [10.1111/mmi.13867](https://doi.org/10.1111/mmi.13867).
- [307] Lucy Megumi Yamauchi, Alida Coppi, Georges Snounou und Photini Sininis. "Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site". In: *Cellular microbiology* 9.5 (2007), S. 1215–1222. ISSN: 1462-5814. DOI: [10.1111/j.1462-5822.2006.00861.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00861.x).
- [308] B. G. Yipp, S. Anand, T. Schollaardt, K. D. Patel, S. Looareesuwan und M. Ho. "Synergism of multiple adhesion molecules in mediating cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to microvascular endothelial cells under flow". In: *Blood* 96.6 (2000), S. 2292–2298. DOI: [10.1182/blood.V96.6.2292](https://doi.org/10.1182/blood.V96.6.2292).
- [309] Scott A. Yuzwa, Matthew S. Macauley, Julia E. Heinonen, Xiaoyang Shan, Rebecca J. Dennis, Yuan He, Garrett E. Whitworth, Keith A. Stubbs, Ernest J. McEachern, Gideon J. Davies und David J. Vocadlo. "A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo". In: *Nature Chemical Biology* 4 (2008), 483 EP –. DOI: [10.1038/nchembio.96](https://doi.org/10.1038/nchembio.96).
- [310] Scott A. Yuzwa, Xiaoyang Shan, Matthew S. Macauley, Thomas Clark, Yuliya Skorobogatko, Keith Vosseller und David J. Vocadlo. "Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation". In: *Nature Chemical Biology* 8 (2012), 393 EP –. DOI: [10.1038/nchembio.797](https://doi.org/10.1038/nchembio.797).
- [311] Natasha E. Zachara und Gerald W. Hart. "O-GlcNAc modification: A nutritional sensor that modulates proteasome function". In: *Trends in cell biology* 14.5 (2004), S. 218–221. ISSN: 0962-8924. DOI: [10.1016/j.tcb.2004.03.005](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.005).
- [312] Natasha E. Zachara, Niall O'Donnell, Win D. Cheung, Jessica J. Mercer, Jamey D. Marth und Gerald W. Hart. "Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells". In: *The Journal of biological chemistry* 279.29 (2004), S. 30133–30142. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M403773200](https://doi.org/10.1074/jbc.M403773200).
- [313] Natasha E. Zachara, Keith Vosseller und Gerald W. Hart. "Detection and analysis of proteins modified by O-linked N-acetylglucosamine". In: *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 12 (2011), Unit12.8. ISSN: 1934-3655. DOI: [10.1002/0471140864.ps1208s66](https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1208s66).
- [314] Quira Zeidan, Zihao Wang, Antonio De Maio und Gerald W. Hart. "O-GlcNAc Cycling Enzymes Associate with the Translational Machinery and Modify Core Ribosomal Proteins". In: *Molecular Biology of the Cell* 21.12 (Juni 2010). Hrsg. von M. Bishr Omary, S. 1922–1936. DOI: [10.1091/mbc.e09-11-0941](https://doi.org/10.1091/mbc.e09-11-0941).

- [315] Rodolfo Zentella, Jianhong Hu, Wen-Ping Hsieh, Peter A. Matsumoto, Andrew Dawdy, Benjamin Barnhill, Harriette Oldenhof, Lynn M. Hartweck, Sushmit Maitra, Stephen G. Thomas, Shelley Cockrell, Michael Boyce u. a. "O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in Arabidopsis". In: *Genes & development* 30.2 (2016), S. 164–176. DOI: [10.1101/gad.270587.115](https://doi.org/10.1101/gad.270587.115).
- [316] Fengxue Zhang, Kaihong Su, Xiaoyong Yang, Damon B. Bowe, Andrew J. Paterson und Jeffrey E. Kudlow. "O-GlcNAc Modification Is an Endogenous Inhibitor of the Proteasome". In: *Cell* 115.6 (Dez. 2003), S. 715–725. DOI: [10.1016/s0092-8674\(03\)00974-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00974-7).
- [317] Yao Zhang, Changjin Huang, Sangtae Kim, Mahdi Golkaram, Matthew W. A. Dixon, Leann Tilley, Ju Li, Sulin Zhang und Subra Suresh. "Multiple stiffening effects of nanoscale knobs on human red blood cells infected with Plasmodium falciparum malaria parasite". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112.19 (2015), S. 6068–6073. ISSN: 0027-8424. DOI: [10.1073/pnas.1505584112](https://doi.org/10.1073/pnas.1505584112).

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER*INNEN

Meine akademischen Lehrer*innen waren die Damen/Herren:

Adamkiewicz, Battenfeld, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Best, Bien, Bohlander, Brehm, Bösner, Cetin, Czubayko, Dannlowski, Daut, Donner-Banzhoff Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Görg, Gress, Grosse, Grundmann, Hertl, Hildebrandt, Hilt, Hofmann, Hoyer, Jaques, Jerrentrup, Kann, Keller, Kill, Kinscherf, Kircher, Klose, Knipper, König, Kruse, Kühnert, Kussin, Lill, Lohoff, Maier, Maisner, Mandic, Moll, Mueller, Müller, Neubauer, Neumüller, Oberwinkler, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Renz, Richter, Riße, Rodelcke, Ruchholtz, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Shams-Eldin, Schmidt, Schwarz, Schneider, Schratt, Schulze, Schwarting, Seifart, Sekundo, Sevinc, Stahl, Stiewe, Strik, Tackenberg, Thieme, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Waldegger, Weber, Weihe, Werner, Wiegand, Wrocklage, Wulf

DANKSAGUNG

Mein Dank geht an alle die mich aktiv und indirekt beim Gelingen dieser Dissertation unterstützt haben. Allen voran Ralph. Vielen Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Einführung in einen so interessanten Themenbereich und die gute und geduldige Betreuung, vor allem auch in der langen Zeit nach Abschluss der Experimente. Danke auch für viele angenehme und gute Gespräche, sowohl bei Tagungen und Besprechungen als auch fachfremd bei einer Tasse Café oder im Stau.

Merci à toute l'équipe du C9. Notamment à Frédéric et Nao pour le soutien avec les analyses de HPLC et MS/MS. Et surtout à Toni de m'avoir accueilli si gentiment à Lille et de m'avoir introduit dans la petite famille international de l'O-GlcNAc. Pour les idées et le soutien au laboratoire. Pour l'éternelle bonne humeur et de nombreux faits passionnants sur l'histoire française du XXe siècle et les réunions de dégustation.

Un grand Merci et bisous à Moyira, hermanita de labo. Pour d'innombrables rires, sans jamais s'ennuyer à attendre les réactions. Pour les vers et le mescal. La doctora qui a prouvé avant moi que nous ne sommes pas si nuls après tout.

Danke an Hosam für die große Unterstützung mit den Kulturen in sehr entspannter Arbeitsumgebung und an Jörg und Eva Herker für das verlässliche technische und organisatorische Backup.

Vielen Dank an Prof. Becker und Nadine Biedenkopf für die Vermittlung des DZIF Stipendiums an mich als Nicht-Virologen.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für die enorme Unterstützung; das Privileg, sich keine Sorgen machen zu müssen und selbstbewusst meinen Lebensweg gehen zu können; die vielen Fertigkeiten, die ich von euch gelernt habe und die Interessen die ihr teils geweckt, teils unterstützt habt. Stets in dem Vertrauen, dass Bub es schon ordentlich macht ...und wenn man ihn vielleicht auch nochmal sanft an das Eine oder Andere erinnern und bei der Satzzeichensetzung unterstützen muss.

Und vor allem an Angie, die dieses Vertrauen stärkt, im gemeinsamen Entwurf einer Zukunft; und die beweist, dass die richtige Ablenkung auch sehr konstruktiv sein kann.

Dank an alle Menschen bei denen ich unterkam und auf deren Küchentischen diese Arbeit entstanden ist. Yann und Nicki in Lille, alle Bewohner*innen der „Burg“ am Grassenberg deren Nennung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde und alle, die in der Dennewitzstraße monatelang nur eingeschränkt Platz zum Kochen hatten.

Ebenfalls vielen Dank an alle Menschen und Organisationen, die sich um die wahrscheinlich viel wichtigeren Probleme unserer Umwelt und des menschlichen Zusammenlebens auf der Welt kümmern und kummern und darin Zeit investieren, während ich meiner Ausbildung, meinem Beruf und der Vollendung dieser Arbeit folge. Aus den Vielen möchte ich hier im Besonderen nennen: Die Medinetze/Medibüros und mit einem speziellen Gruß Medinetz Marburg, Medico international, PRO ASYL, Amnesty International, IPPNW, Attac, Greenpeace, Robin Wood, Extinction Rebellion und alle Kinder und Jugendlichen die sich mit Fridays for Future für den Erhalt eines lebenswerten Planetens einsetzen.

COLOPHON

Diese Arbeit entstand in \LaTeX .

Als Editor dienten `TeXnicCenter` und `Texmaker`.

Grafiken wurden mit Hilfe von `Inkscape` (Vector-Grafiken) und `GIMP` (Photos) bearbeitet und erstellt. Tabellen und Berechnungen erfolgten mit `Libre Office Calc`.

Satz und Layout dieses Dokumentes erfolgten mit Hilfe von André Miedes `classicthesis`, dessen Stil von Robert Bringhurst's Buch über Typografie „*The Elements of Typographic Style*“ inspiriert ist. `classicthesis` ist frei verfügbar für \LaTeX und `LyX`:

<https://bitbucket.org/amiede/classicthesis/>

Zufriedene Nutzer*innen von `classicthesis` schicken in der Regel eine Postkarte an den Autor, eine Sammlung bisher eingegangener Postkarten wird hier vorgestellt:

<http://postcards.miede.de/>

Mit finanzieller Förderung durch:



Final Version as of 1. November 2021 (`classicthesis` version 1.0).