

**Analyse von zellulären und molekularen
Wechselwirkungen
der *PfCCp*-Multiadhäsionsdomänenproteine und
funktionale Charakterisierung von *PfCCp4*
in den Sexualstadien des Malariaerregers
*Plasmodium falciparum***

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Sabrina M. Scholz
geboren in Erlenbach am Main
Würzburg 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Martin J. Müller
1. Gutachter:	Prof. Dr. Jörg Hacker
2. Gutachter:	PD Dr. Volker Heussler

Tag des Promotionskolloquiums:

1. Prüfer:	Prof. Dr. Jörg Hacker
2. Prüfer:	PD Dr. Volker Heussler

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation

„Analyse von zellulären und molekularen Wechselwirkungen der PfCCp-Multi-adhäsionsdomänenproteine und funktionale Charakterisierung von PfCCp4 in den Sexualstadien des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*“

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, im Dezember 2007

Sabrina M. Scholz

Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an folgende Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit von Januar 2005 bis Dezember 2007 beigetragen haben:

Dr. G. Pradel für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit, die Bereitstellung des vielseitigen Themas, die Erweiterung meines Horizonts und die Möglichkeit, an zahlreichen Tagungen teilzunehmen und fünf Monate am Weill-Medical-Center in New York zu forschen.

Prof. Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker für die Möglichkeit, an seinem Institut promovieren zu können, und die Übernahme des Erstgutachtens.

PD Dr. V. Heussler für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine Bereitschaft, Mitglied meiner Prüfungskommission zu sein.

Prof. Dr. G. Krohne und seinem Team für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie und eine immer freundliche Arbeitsatmosphäre.

Prof. Dr. T. J. Templeton und seinem Team für die Möglichkeit, meinen Forschungsaufenthalt am Weill-Medical-Center in ihrem Labor durchzuführen.

Dr. C. Lavazec für die Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken an *PfCCp4*-KO-Parasiten.

Dr. C. Moreira für die Bereitstellung der *PfCCp1*-KO-Stämme und ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.

Dr. B. Weissbrich und seinem Team für die immer verlässliche und rasche Dienstleistung des Sequenzierens.

Dr. C. Wagner, S. Weiss, N. Simon und L. Sologub für die Übernahme der Tierversuche, ihre stets gute Laune und Unterstützung mit Rat und Tat.

Allen „**Pradels**“, „**Haucks**“ und „**Schwämmen**“ für die unvergessliche Zeit und besonders Nina Simon, Rebecca Bosse und Shruti Agarwal für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen **Mitarbeitern des IMIB/ZINF** für die freundschaftliche und harmonische Zusammenarbeit.

Dem **DAAD** für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes in New York.

*“This day relenting God
Hath placed within my hand a wondrous thing; and God be praised.
At His command, seeking His secret deeds with tears and toiling breath,
I find Thy cunning seeds, o million-murdering Death.
I know this little thing a myriad men will save.
O Death, where is Thy sting? Thy victory, o grave?”*

Sir Ronald Ross, 20. August 1897

Für meine Familie und meine Freunde.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Tropenkrankheit Malaria	1
1.1.1 Verbreitung	1
1.1.2 Krankheitsbild	2
1.2 Der Malariaerreger <i>Plasmodium falciparum</i>	4
1.2.1 Taxonomie und Morphologie	4
1.2.2 Lebenszyklus.....	6
1.3 Impfstoffforschung	13
1.3.1 Parasitäre Inhibitions- und Immunevasionsmechanismen	13
1.3.2 Präerythrozytäre Vakzine	14
1.3.3 Erythrozytäre Vakzine	15
1.3.4 Transmissionsblockierende Vakzine	15
1.4 PfCCp-Proteine: Sexualstadienspezifische Proteine mit multiplen Adhäsions- domänen	17
1.4.1 Identifizierung und Aufbau	17
1.4.2 Expression und Funktionsanalysen	20
1.5 Ziel der Arbeit	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Geräte.....	24
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.3 Laborkits und Enzyme	30
2.1.4 Puffer und Lösungen	30
2.1.5 Medien und Agarplatten	35
2.1.6 Zelllinien und Bakterienstämme	37
2.1.7 Plasmide.....	37
2.1.8 Oligonukleotide	40
2.1.9 DNA- und Proteingrößenstandards	41

2.1.10	Antikörper	42
2.1.11	PlasmoDB-Identifizierungsnummern	43
2.1.12	Verwendete Computerprogramme	44
2.2	Methoden	44
2.2.1	Mikrobiologische und zellbiologische Methoden	44
2.2.1.1	Desinfizieren und Sterilisieren	44
2.2.1.2	Kultivierung von Bakterien	45
2.2.1.3	Konservierung von Bakterienkulturen	45
2.2.1.4	Transformation kompetenter Bakterienstämme	46
2.2.1.5	Kultivierung und Konservierung von <i>P. falciparum</i>	46
2.2.1.6	Bestimmung der Parasitämie mittels Giemsa-Färbung	50
2.2.1.7	Exflagellationstest	50
2.2.1.8	Aufreinigung von Parasitenstadien	51
2.2.1.9	Transfektion von <i>P. falciparum</i> und klonale Selektion von KO-Parasiten	52
2.2.1.10	Immunfluoreszenzstudien	54
2.2.1.11	Elektronenmikroskopische Studien	56
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	58
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	58
2.2.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	58
2.2.2.3	Aufreinigung von PCR-Fragmenten	61
2.2.2.4	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen	62
2.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	63
2.2.2.6	Elution von DNA aus Agarosegelen	63
2.2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	64
2.2.2.8	Amplifizierung und Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien	64
2.2.2.9	Sequenzierung von Nukleinsäuren	65
2.2.2.10	Isolation von RNA und Herstellung von cDNA	66
2.2.2.11	Isolation genomischer DNA aus <i>P. falciparum</i>	68
2.2.2.12	Southern-Blot-Restriktionsanalyse	69
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	73
2.2.3.1	Expression rekombinanter Proteine	73
2.2.3.2	Aufreinigung rekombinanter Proteine	74
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	75
2.2.3.4	SDS-Gelfärbung, Bestimmung der Proteinkonzentration und Konservierung	77

2.2.3.5	Western-Blot-Analyse	77
2.2.3.6	Interaktionsstudien.....	79
2.2.3.7	Gewinnung von Antikörpern	83
3	Ergebnisse	84
3.1	Charakterisierung von <i>PfCCp4</i> im Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	84
3.1.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter <i>PfCCp4</i> -Proteine	84
3.1.1.1	Expression rekombinanter <i>PfCCp4</i> -Proteine.....	85
3.1.1.2	Aufreinigung rekombinanter <i>PfCCp4</i> -Proteine	87
3.1.1.3	Negativkontrollen - GST- und 6His/SUMO-Peptid.....	87
3.1.1.4	Test der Immunseren an rekombinanten Proteinen	88
3.1.2	Expressionsanalyse von <i>PfCCp4</i>	88
3.1.2.1	Charakterisierung von <i>PfCCp4</i> auf RNA-Ebene.....	88
3.1.2.2	Western-Blot-Analysen zur <i>PfCCp4</i> -Expression an WT-Lysaten	90
3.1.2.3	Immunfluoreszenzstudien.....	91
3.1.2.4	Transmissionselektronenmikroskopie.....	95
3.1.3	Verifizierung von <i>PfCCp4-knockout</i> -Parasiten	96
3.1.3.1	Diagnostische PCR.....	96
3.1.3.2	Southern-Blot-Restriktionsanalysen	97
3.1.4	Phänotypenanalysen von <i>PfCCp4-knockout</i> -Parasiten.....	98
3.1.4.1	Parasitenentwicklung <i>in vitro</i>	98
3.1.4.2	Membranfütterungen von <i>Anopheles</i> -Mücken.....	99
3.2	Funktionsanalyse der <i>PfCCp</i>-Proteine durch Interaktionsstudien	100
3.2.1	Ko-abhängige Expression	100
3.2.2	Affinitätschromatographiestudien	102
3.2.3	Ko-Immunpräzipitationsstudien	108
3.2.4	Zelladhäsionsstudien.....	110
4	Diskussion	112
4.1	Expression und Funktion von <i>PfCCp4</i> während der Sexualphase von <i>P. falciparum</i>	112

4.2 Molekulare Wechselwirkungen von PfCCp-Proteinen während der Sexualphase von <i>P. falciparum</i>	117
4.3 Die Rolle der PfCCp-Proteine während der Befruchtungsvorgänge in <i>P. falciparum</i> - eine Arbeitshypothese	122
4.4 Potential der PfCCp-Proteine als TBV-Komponenten	126
5 Ausblick	129
6 Zusammenfassung	131
7 Summary	133
8 Literaturverzeichnis	135
9 Anhang	153
Abkürzungen und Einheiten	153
Abbildungsverzeichnis.....	157
Tabellenverzeichnis.....	161
Curriculum Vitae.....	162
Publikationen und Konferenzbeiträge	165

1 Einleitung

1.1 Die Tropenkrankheit Malaria

1.1.1 Verbreitung

Obwohl Malaria bereits seit über 50.000 Jahren die Menschheit geplagt hatte (Joy *et al.*, 2003), ereignete sich der erste große wissenschaftliche Durchbruch in der Malariaforschung erst im Jahre 1880. Damals entdeckte der französische Militärarzt Charles Louis Alphonse Laveran im Blut von Malariapatienten Einzeller innerhalb der roten Blutzellen. Er formulierte daraufhin die Hypothese, dass jene Parasiten Ursache der Malaria seien und erhielt für diese und folgende Entdeckungen 1907 den Nobel-Preis für Physiologie. Etwa zur gleichen Zeit gelang es dem britischen Offizier des *Indian-Medical-Service* Sir Ronald Ross, den Übertragungsweg der Malariaparasiten zu identifizieren. 1902 wurde ihm dafür der Nobel-Preis für Medizin verliehen.

Trotz intensiver Forschung und des *Global-Eradication-of-Malaria*-Programms der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in den 1950er Jahren zählt Malaria neben AIDS und Tuberkulose auch heute immer noch zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit und nimmt den ersten Platz unter den Tropenkrankheiten ein (Snow *et al.*, 2005). Trotz Prophylaxe- und Therapiemöglichkeiten werden jährlich 300 bis 500 Millionen Neuinfektionen und ein bis drei Millionen Tote verzeichnet (WHO, 2007). Besonders betroffen sind Kinder unter fünf Jahren aufgrund mangelnden Immunschutzes sowie Frauen während der Schwangerschaft (Menendez *et al.*, 2000; Saute *et al.*, 2002). Malaria ist in mehr als 100 Ländern der Tropen und Subtropen endemisch (Abb. 1.1), jedoch leben 90 % der Erkrankten auf dem afrikanischen Kontinent in Gebieten südlich der Sahara. In Deutschland werden jährlich etwa 900 Erkrankte gemeldet (Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 35).

Malaria wird durch einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen. Weltweit existieren mehr als 100 Plasmodienspezies, die viele Tierarten wie z.B. Amphibien, Reptilien, Vögel und Säuger infizieren können. Von den vier humanpathogenen Erregern *P. ovale* und *P. vivax* (Erreger der Malaria tertiana), *P. malariae* (Erreger der Malaria quartana) und *P. falciparum* (Erreger der Malaria tropica) verursacht letztgenannter die höchste Mortalitätsrate. Er ist zudem für die meisten Malariainfektionen südlich der Sahara verantwortlich. In Asien, Lateinamerika und einigen Teilen Afrikas ist jedoch *P. vivax* vorherrschend, während Infektionen mit *P. malariae* und *P. ovale* eher selten verzeichnet werden. *P. malariae* findet sich hauptsächlich in West- und Ostafrika, sowie in Teilen Indiens, *P. ovale* in Westafrika und auf Inseln im Pazifik. Von den tierpathogenen Plasmodienarten

sind vor allem *P. yoelii*, *P. chabaudi* sowie *P. berghei* (Erreger der Nagermalaria) und *P. gallinaceum* (Erreger der Vogel malaria) als Modellorganismen in der Malariaforschung von Bedeutung (Zimmerman *et al.*, 2004).

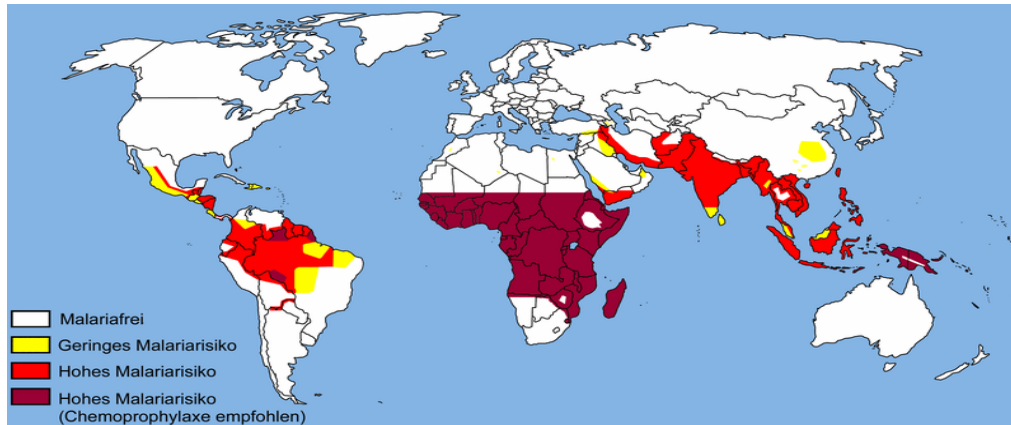


Abb. 1.1. Weltweite Malariarisikogebiete. Mehr als 40 % der Weltbevölkerung lebt in Endemiegebieten, zu denen große Teile Afrikas, Asiens und Südamerikas zählen.¹ (Quelle, siehe Abbildungsverzeichnis)

Malaria wird ausschließlich durch die weiblichen Stechmücken der Gattung *Anopheles* übertragen, die nach der Befruchtung durch Männchen zusätzlich die Proteine einer Blutmahlzeit für ihre Eientwicklung benötigen (Clements, 1992). Nur etwa 40 von über 400 *Anopheles*-Arten sind als Zwischenwirt der Plasmodien relevant (Service, 1993).

Insgesamt stellt Malaria nicht nur eine enorme Bürde für den Gesundheitssektor, sondern auch für die Wirtschaft der am stärksten betroffenen Länder dar. Ihre jährlichen Wachstumseinbußen werden auf bis zu 1,3 % geschätzt (Sachs und Malaney, 2002). Rasch zunehmende Resistenzbildung der Erreger gegen gängige und vor allem in den Entwicklungsländern finanzierbare Medikamente, sowie eine sich nur langsam entwickelnde Gesundheitsversorgung in Afrika und Asien verdeutlichen die Dringlichkeit, effektive Maßnahmen zur Malariakontrolle zu erschließen. Ziel ist es, den betroffenen Ländern eine ihrer größten volkswirtschaftlichen Bürden zu nehmen - den Arbeitskraftverlust durch Malaria (Greenwood und Mutabingwa, 2002). Den Weg dorthin könnte die Impfstoffforschung ebnen.

1.1.2 Krankheitsbild

Die drei Krankheitsbilder der Malaria unterscheiden sich in der Periodizität der Fieberschübe, dem Verlauf und der Behandlung. Bei Malaria tertiana handelt es sich um eine der gutartigen Malariaformen, bei der sich die Fieberschübe alle zwei Tage im drei- bis vier-Stunden-

Rhythmus wiederholen. Die Inkubationszeit beträgt zwischen zwölf und 18 Tagen, kann allerdings auch mehrere Monate dauern, wenn der Verlauf der Infektion durch Chemoprophylaxe verlangsamt wird. Das charakteristischste Symptom stellt das zyklisch auftretende Fieber dar, welches durch das synchronisierte Aufbrechen der parasitenbeladenen Erythrozyten und die damit verbundene Toxin- und Zytokinfreisetzung hervorgerufen wird. Als weitere Symptome treten Schüttelfrost, Schweißausbrüche, Schwindel, Übelkeit, Erbrechen sowie Kopf- und Gliederschmerzen auf. Häufig verläuft diese Form harmlos und meist beginnt eine spontane Heilung bereits nach zwölf Fieberschüben. Jedoch können die latent in der Leber verbleibenden Hypnozoiten nach einer Ruhephase von Monaten bis Jahren zum erneuten Ausbruch der Krankheit führen.

Auch bei der Malaria quartana handelt es sich um eine gutartige Form der Malaria. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 18 und 40 Tagen und ist somit erheblich länger als bei den übrigen Krankheitsformen. Die Fieberschübe kehren alle 72 Stunden wieder und dauern vier bis fünf Stunden lang an. Nach 20 Fieberzyklen heilt diese ebenfalls häufig harmlos verlaufende Malariavariante meist spontan aus. Jedoch wurden hier Rückfälle sogar nach mehr als 50 Jahren beschrieben, für die nicht Hypnozoiten der Leber, sondern ein Dauerbefall des Blutes im subdiagnostischen Bereich verantwortlich sind.

Bei der schwersten Form der Malaria, Malaria tropica, liegen durchschnittlich zwölf Tage zwischen Infektion und Krankheitsausbruch. Malaria tropica zeichnet sich wegen des asynchronen Vermehrungszyklus des Erregers *P. falciparum* durch sehr plötzliche, unregelmäßig auftretende Fieberschübe aus und verursacht häufig schwere Komplikationen, die mit Lungenödem, Schock, Nieren- und Kreislaufversagen einhergehen. Neurologische Komplikationen reichen bei der zerebralen Malaria von Bewusstseinsstörungen und Krampfanfällen bis hin zu Koma und Tod. Gründe für diese schweren Komplikationen der Malaria tropica liegen in der besonderen Fähigkeit von *P. falciparum*, befallene Erythrozyten durch einen parasitenkodierte Oberflächenrezeptor an das Endothel von Blutgefäßen binden zu lassen (Sequestrierung). Diese Anhaftung und die mangelnde Verformbarkeit der befallenen Zellen führen zur Verstopfung der Kapillaren und somit zu einer Störung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Umgebung. Diese Mikrozirkulationsstörungen können beträchtliche Auswirkungen auf die betroffenen Organe nach sich ziehen. Für Säuglinge und Kleinkinder besonders schwerwiegend ist zudem die hämolytische Anämie, hervorgerufen durch die sehr hohe Parasitenlast im Falle von *P. falciparum*. Diese Spezies kann im Gegensatz zu anderen Malariaerregern Erythrozyten aller Altersstufen befallen und so nahezu 50 % der Blutkörperchen parasitieren. Weitere Ursachen der Anämie sind die Dämpfung der Erythropoese im Knochenmark durch die oben genannte Zytokinfreisetzung und der Abbau von befallenen Erythrozyten in der Milz. Folgen der massiven Hämolyse stellen sowohl Hämoglobinurie als auch akutes Nierenversagen dar. Bei Schwangeren und

Kindern kann zudem lebensbedrohliche Hypoglykämie auftreten, die allein oder in Kombination mit anderen Symptomen ebenfalls zum Koma führt. Schäden der Milz, der Lunge und Beeinträchtigungen des Magen-Darm-Trakts sind keine Seltenheit. Unbehandelt heilt die komplizierte Malaria nicht aus, sondern führt meist nach kurzer Zeit zum Tod (Marsh, 1999; *Centers for Disease Control and Prevention*, 2007).

Die Vorbeugung einer Malariainfektion kann auf zwei verschiedenen Ebenen erfolgen: durch Expositionsprophylaxe oder durch Chemoprophylaxe. Während die Vermeidung von Insektenstichen das wichtigste Element der Malariavorbeugung darstellt, ist die medikamentöse Prophylaxe hauptsächlich für Reisende sinnvoll, die sich nicht dauerhaft in Endemiegebieten aufhalten. Expositionsprophylaxe beinhaltet das Tragen langer, heller Kleidung, die regelmäßige Anwendung von Insektenschutzmitteln und das Aufhalten in mückensicheren Räumen, in denen Fenstergitter, Klimaanlage, Räucherspiralen und imprägnierte Moskitonetze vor Mücken schützen.

Für die medikamentöse Vorbeugung steht eine Reihe von Präparaten zur Verfügung: Resochin[®] mit dem Wirkstoff Chloroquin, Paludrine[®], eine Kombination der Wirkstoffe Chloroquin und Proguanil, Lariam[®] basierend auf dem Wirkstoff Mefloquin, Malarone[®] mit den Hauptbestandteilen Atovaquon und Proguanil sowie das Antibiotikum Doxycyclin.

Das älteste Antimalariamittel zur Therapie einer bestehenden Erkrankung ist Chinin. Dabei handelt es sich um einen Bestandteil der Rinde des Baumes *Cinchona officinalis*, welches als Fiebertmittel bereits im 17. Jahrhundert aus Peru eingeführt wurde. Es wird auch heute noch zusammen mit Doxycyclin zur raschen Behandlung einer komplizierten Malaria eingesetzt (Löscher *et al.*, 2003). Neuere Antimalariamittel basieren auf Artemisinin (Ferreira, 2007), welches aus dem Beifußgewächs *Artemisia annua* gewonnen wird. Trotzdem stellen die rasch zunehmenden Resistenzen der Malariaerreger und das Fehlen eines Impfstoffes, sowohl bei der Prophylaxe als auch bei der Therapie, ein stetig wachsendes Problem dar.

1.2 Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum*

1.2.1 Taxonomie und Morphologie

Nach Hausmann und Hülsmann (1996) kann folgende taxonomische Einordnung von *P. falciparum* in die Systematik parasitischer Protozoa vorgenommen werden:

Reich	Mastigota
Überstamm	Metakaryota
Stamm	Alevolata
Unterstamm	Apicomplexa
Klasse	Haematozoa
Ordnung	Haemosporida
Familie	Plasmodiidae
Gattung	<i>Plasmodium</i>
Art	<i>P. falciparum</i>

Wie bei allen Apikomplexa handelt es sich bei dem einzelligen Eukaryoten *P. falciparum* um einen obligaten Endoparasiten von Invertebraten und Vertebraten. Gemeinsam ist allen der aus mehreren Organellen bestehende, namensgebende Apikalkomplex, dem eine Funktion bei der Wirtszellinvasion zugesprochen wird (Cowman und Crabb, 2006). Beim Merozoiten, dem erythrozytären Invasionsstadium von *Plasmodium*, gehören zum Apikalkomplex zwei keulenförmige Rhoptrien, zahlreiche vesikuläre Mikronemen, die polaren Ringe an der apikalen Erhebung, von denen Mikrotubuli ausgehen, und elektronendichte Granula (Abb. 1.2A). In der Nähe des Apikalkomplexes befindet sich der Apikoplast, eine durch sekundäre Endosymbiose erworbene Organelle, die über ein 35-kb-großes Genom verfügt. Er ist fest an das Mitochondrium gebunden (Kobayashi *et al.*, 2007) und stellt durch seinen plastidähnlichen Metabolismus einen Angriffspunkt für neue Antimalariamedikamente dar (Goodman und McFadden, 2007; Wiesner und Jomaa, 2007). Begrenzt wird der Merozoit von einer Pellikula aus drei verschiedenen Membranen. An die außen liegende Plasmamembran schließt sich nach innen ein Komplex aus zwei aneinander liegenden Membranen an, die den für die Alveolata typischen pellikulären Zwischenraum umschließen. Ebenfalls Bestandteil der Pellikula sind unter der Oberfläche verlaufende Mikrotubuli, die der Zelle eine feste Gestalt geben und an der Bewegung des Parasiten beteiligt sind. Ein Nukleus mit einem haploiden Genom von 22,8 Megabasen auf 14 Chromosomen, und Ribosomen vervollständigen die Zellausstattung. Während der intraerythrozytären Phase ist der Parasit von einer parasitophoren Vakuole umschlossen und bildet rauhes, endoplasmatisches Retikulum (ER) sowie ein Golgi-ähnliches Organell (Abb. 1.2B). Die Nahrungsaufnahme erfolgt über Zytostome mittels Endozytose, bei der Nahrungsvakuolen gebildet werden. In den Pigmentvakuolen wird Hämozoin, das Abbauprodukt von Hämoglobin, in brauner kristalliner Form abgelagert. Ein weiteres gemeinsames Merkmal aller Apikomplexa ist der Generationswechsel von geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Fortpflanzung. Er verläuft wie für die Apikomplexa typisch in drei Phasen: Schizogonie, Gamogonie und Sporogonie (Mehlhorn *et al.*, 1998). Dabei kommt es zu einem Wirtswechsel zwischen dem Menschen,

der als Zwischenwirt fungiert und der *Anopheles*-Mücke, dem Endwirt. Im folgenden Abschnitt soll dies eingehender beschrieben werden. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der sexuellen Entwicklung von *P. falciparum*, da diese von zentraler Bedeutung für die vorliegende Arbeit war.

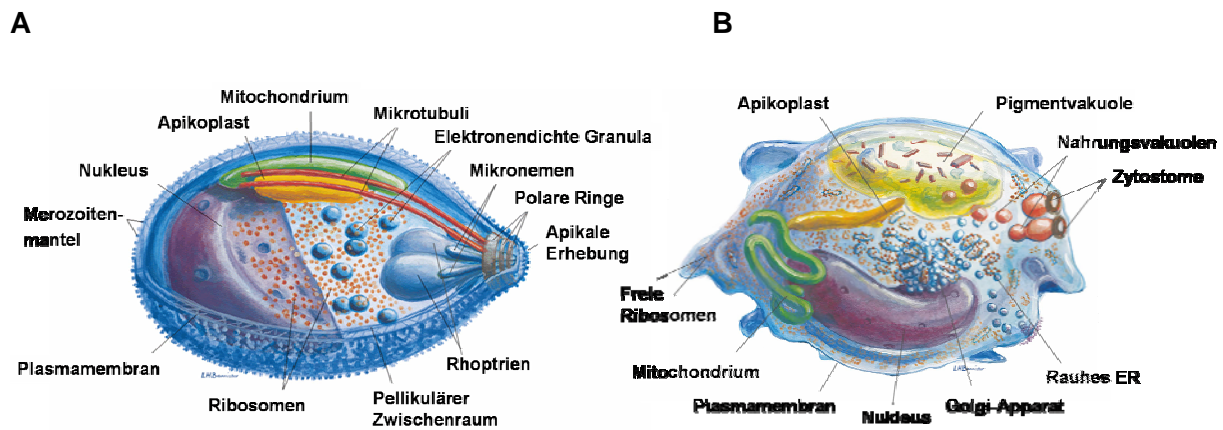


Abb. 1.2. Dreidimensionale Organisation von *P.-falciparum*-Stadien. A. Merozoit. B. Trophozoit.²

1.2.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *P. falciparum* (Abb. 1.3) beginnt mit dem Stich einer *Anopheles*-Mücke, bei der durch Speichelabsonderung 15 bis 20 Sporozoiten in die Blutkapillaren des Menschen injiziert werden (Rosenberg *et al.*, 1990). Diese gelangen innerhalb weniger Minuten durch den Blutstrom zur Leber, wo sie in die Zellen des Lebergewebes (Hepatozyten) eindringen und durch exoerythrozytäre Schizogonie zu Leberschizonten heranreifen. Nach etwa sieben bis 15 Tagen werden bis zu 30.000 Merozoiten in die Blutbahn entlassen und damit die exoerythrozytäre Entwicklungsphase abgeschlossen. Nur bei *P. vivax* und *P. ovale* verbleiben über Monate und Jahre hinweg ungeteilte Ruhestadien (Hypnozoiten) im Lebergewebe, die durch bisher unbekannte Stimuli zu Schizonten heranreifen und zu den charakteristischen Rückfällen der Malaria tertiana führen können. Die in den Blutstrom entlassenen Merozoiten befallen aktiv innerhalb weniger Minuten Erythrozyten und treten in ihre erythrozytäre Entwicklungsphase ein. Zunächst befindet sich der Parasit in einem so genannten Ringstadium, während dessen er seine eigene Plasmamembran und die ihn umgebende Erythrozytenmembran für einen regen Stoffaustausch mit der Wirtszelle umstrukturiert. Es werden Nahrungsvakuolen gebildet, in denen die Aufnahme und der Verdau von Hämoglobin als Aminosäurequelle stattfinden. Das toxische Abbauprodukt Häm wird später zum atoxischen Hämzoin polymerisiert und dicht gepackt als braunes

Pseudokristall in den Pigmentvakuolen des reifen Trophozoiten abgelagert (Slater *et al.*, 1991; Bohle *et al.*, 1997). Hier greift die Antimalariaaktivität von Medikamenten wie Chloroquin an, die die Detoxifizierung von Häm verhindern (Le Bras und Durand, 2003).

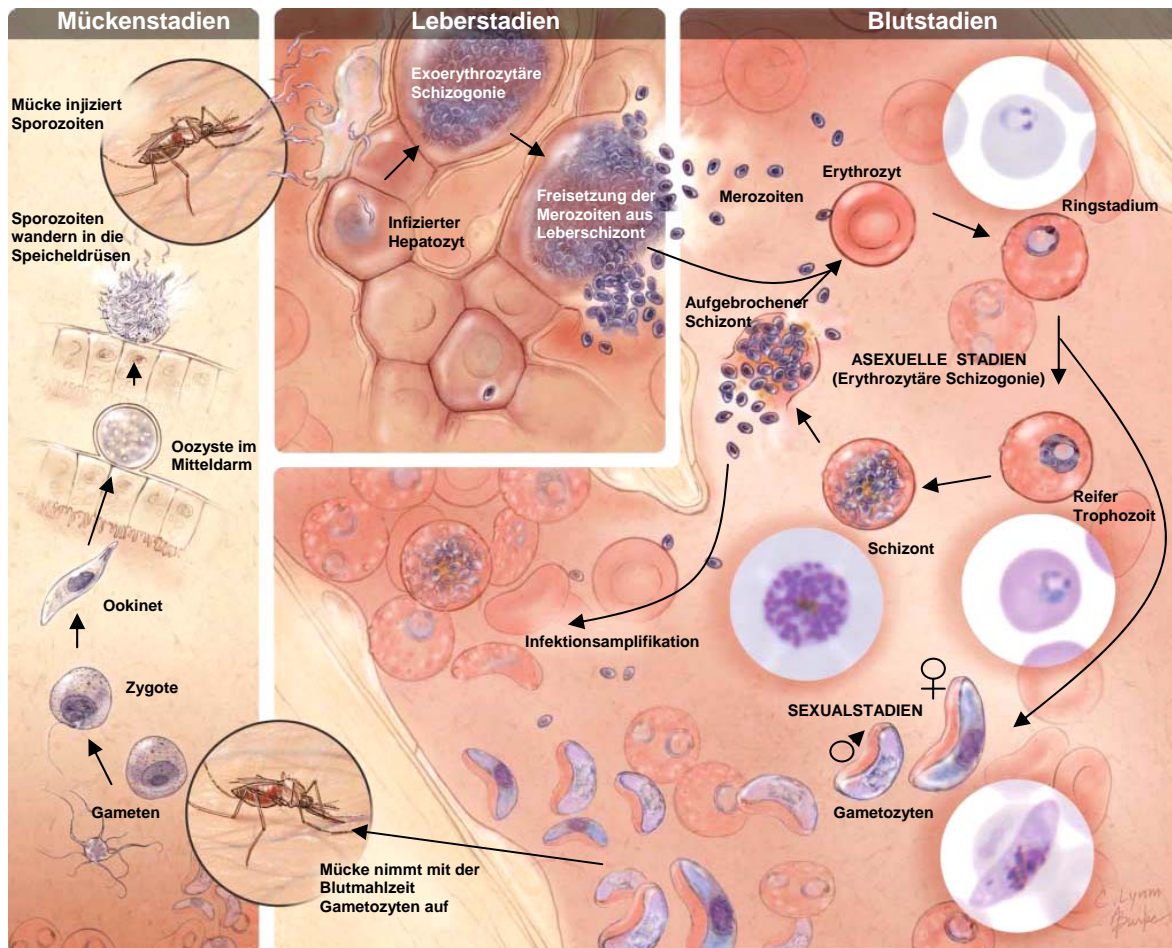


Abb. 1.3. Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*.³

Nach 18 bis 24 Stunden beginnt der Parasit durch rege mRNA- und Proteinsynthese vermehrt, Zellmaterial zu produzieren. Er wird zum reifen Trophozoiten, jener Entwicklungsstufe, die die Folatantagonisten unter den Malariamedikamenten wie Pyrimethamin, Sulfadoxin und Proguanil durch Eingriff in den Nukleinsäuremetabolismus hemmen (Schlitzer, 2007). Nach 36 Stunden erfolgt durch Schizogonie die Kernteilung und es fusionieren die Nahrungsvakuolen zu einer einzigen großen Residualvakuole. Diese wird zusammen mit den infektionsfähigen Merozoiten im Falle von *P. falciparum* etwa 48 Stunden nach Erythrozytenbefall freigesetzt. Bei Ruptur der Vakuole gelangen die in den Restkörpern enthaltenen Komponenten (Hämoglobin, Lipide, Phospholipide und Proteine) in den Blutstrom, regen die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen an und lösen dadurch die charakteristischen Fieberschübe aus. Diese können bei den synchron verlaufenden Vermehrungszyklen von *P. ovale* und *P. vivax* alle 48 Stunden (Malaria tertiana), bei *P. malariae* alle 72 Stunden

(Malaria quartana) beobachtet werden. Der asynchrone Vermehrungszyklus von *P. falciparum* erschwert eine eindeutige Malariadiagnose aufgrund unregelmäßiger Fieberschübe.

Aus jeder Schizogonie gehen bei *P. falciparum* jeweils acht bis zwölf Merozoiten hervor, die neue Erythrozyten befallen. Mehrere Tage bis Wochen nach Beginn der erythrozytären Schizogonie differenziert sich ein Teil der Merozoiten zu Sexualstadien (Gamogonie). Etwa 15 Tage benötigt ein sexuell determinierter Merozoit, um sich zu einem reifen Gametozyten zu entwickeln. Dabei differenzieren sich alle Tochtermerozoiten eines einzelnen Schizonten entweder nur zu asexuellen oder nur zu sexuellen Parasiten (Bruce *et al.*, 1990). Ebenso entstehen aus allen Merozoiten, die aus einem einzelnen sexuell determinierten Schizonten hervorgehen, wiederum entweder nur weibliche oder nur männliche Gametozyten (Silvestrini *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Die Gametozytogenese wird aufgrund morphologischer Kriterien in fünf Stadien eingeteilt (Abb. 1.4).

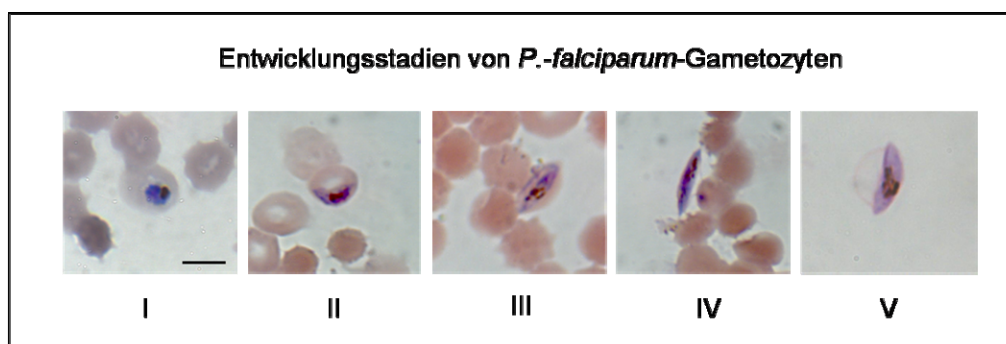


Abb. 1.4. Die fünf Reifestadien von Gametozyten. I bis III: der reife Trophozoit formt sich zu einem länglichen Gebilde; Stadium IV: der Gametozyt weist eine spindelförmige Gestalt auf; Stadium V: der Gametozyt gewinnt an Volumen und besitzt abgerundete Zellpole. Größenangabe, 5 μm .⁴

Während sich Gametozyten des Stadium I morphologisch nicht von asexuellen Trophozoiten unterscheiden lassen, nehmen Gametozyten ab dem späten Stadium II eine halbmondförmige Gestalt an. In ihrer Ultrastruktur verändern sie sich durch Bildung eines pellikulären Komplexes aus einer subpellikulären Membran und sich ausdehnenden Mikrotubuli. Diese gehen erst in Stadium V durch Depolymerisierung wieder verloren (Sinden, 1982).

Osmiophile Körperchen (Abb. 1.5), bei denen es sich um membranbegrenzte, elektronendichte Organellen unterhalb der Parasitenoberfläche handelt, stellen ein weiteres gametozytenspezifisches Merkmal dar. Sie treten ab Stadium III der Gametozytogenese auf, vornehmlich in Makrogametozyten (Sinden, 1982). Ihnen wird eine Rolle bei dem Ausbrechen der Gametozyten aus den Erythrozyten zugeschrieben, da sie innerhalb von Minuten nach der Gametozytenaktivierung ihren Inhalt in die parasitophore Vakuole abgeben (Sinden *et al.*, 1978; Alano *et al.*, 1995).

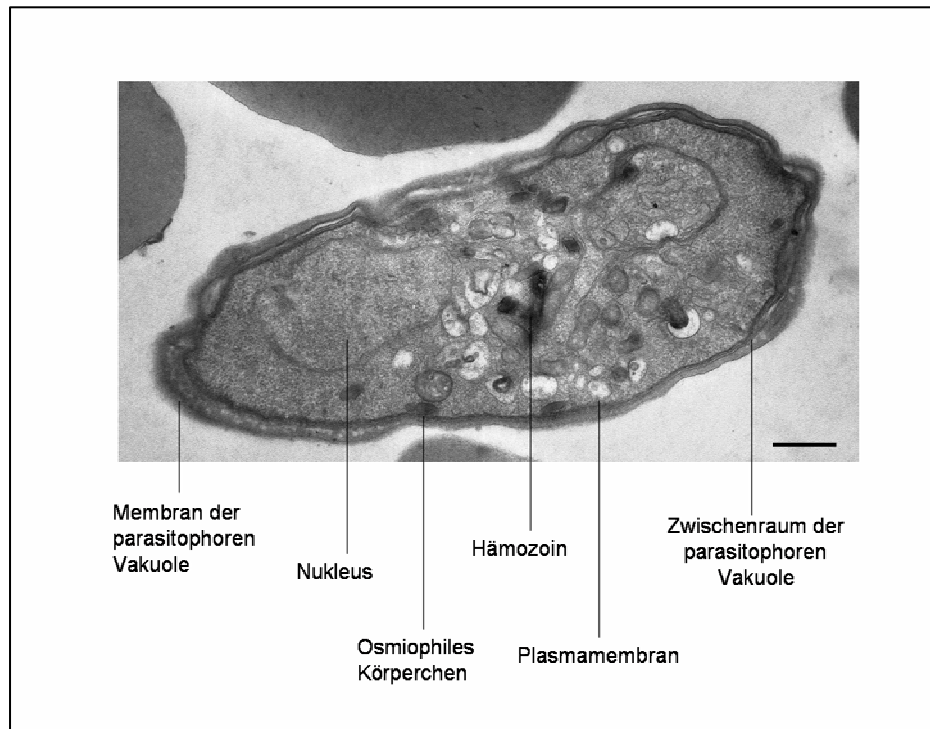


Abb. 1.5. Ultrastruktur eines *P.-falciparum*-Gametozyten. Größenangabe, 1 μm .⁵

Das Geschlecht der Gametozyten kann mit Hilfe einer Giemsa-Färbung und einfacher Lichtmikroskopie ermittelt werden. Während die basophilen Makrogametozyten blau erscheinen, zeigen Mikrogametozyten eine rötliche Färbung. Im Vergleich der Ultrastrukturen besitzen Makrogametozyten zudem ein ausgedehnteres ER und größere Hämozoinpartikel. Insgesamt ist das Geschlechterverhältnis zur weiblichen Seite verschoben, wobei pro Mikrogametozyten etwa fünf Makrogametozyten gebildet werden. Da aus einem Mikrogametozyten in der weiteren Entwicklung acht Mikrogameten entstehen, ergibt sich nach der Gametenbildung etwa ein 1:1-Verhältnis der Geschlechter (Übersichtsartikel Pradel, 2007). Bei einer Blutmahlzeit gelangen hauptsächlich Gametozyten des Stadium V in den Mitteldarm der Mücke, während sich Gametozyten des Stadium I bis IV an Wirtsgewebe wie z.B. Knochenmark anheften, um dem *Screening* des peripheren Bluts in der Milz zu entgehen (Smalley *et al.*, 1981; Rogers *et al.*, 2000). Tab. 1.1 fasst noch einmal die morphologischen Unterschiede im Laufe der Gametozytogenese zusammen.

Tab. 1.1. Morphologische Unterschiede während der Gametozytogenese von *P. falciparum* (Talman *et al.*, 2004).

	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV	Stadium V
Form (lichtmikroskopisch)	IA. Kein Unterschied zu kleinen, runden Trophozoiten IB. Größere, runde Form, charakteristische granuläre Pigmentverteilung	IIA. Elongation im Erythrozyten IIB. D-förmig	D-förmig, leicht gekrümmter Erythrozyt, Rot/Blau-Differenzierung zwischen männlichen und weiblichen Gametozyten	Langer, dünner Parasit, spindelförmig, deutlich gekrümmter Erythrozyt, männlich: verstreutes Pigment, weiblich: eher dichte Pigmentablagerung	Halbmondförmig mit abgerundeten Enden, männlich: Pigmentstreuung, rot; weiblich: dicht gepacktes Pigment, blau
Ultrastruktur	Keine sichtbaren Veränderungen des erythrozytären Plasmalemmas im Gegensatz zu Erythrozyten mit asexuellen Stadien (Knopfstrukturen auf der Oberfläche) Bildung einer flachen Ausstülpung der subpellikulären Membran und Ausbildung einer zusätzlichen Mikrotubulstruktur	Ausdehnung der subpellikulären Membran und des Mikrotubulinkomplexes (verantwortlich für die D-Form) Nukleus terminal lokalisiert oder entlang der Zellenlängsachse gestreckt, teilweise Spindelbildung Sexueller Dimorphismus bezüglich der Kerngröße	Weitere Entwicklung des Komplexes an der subpellikulären Membran wirkt sich auf die Zellform aus Männlicher Nukleus deutlich größer als weiblicher Nukleus Makrogametozyten enthalten mehr Ribosomen, ER und Mitochondrien als Mikrogametozyten	Membran und Mikrotubulinkomplex umgeben den Gametozyten nun völlig (Wiederherstellung der Symmetrie) Bildung membran-gebundener osmiophiler Körperchen Offensichtlicher Sexualdimorphismus: Ribosomen, Mitochondrien und osmiophile Körperchen zahlreicher in weiblichen Gametozyten; männlicher Nukleus ist größer; in männlichen Gametozyten sind die Kinetochore der Chromosomen jeweils an ein elektronendichtes Körperchen gebunden, das sich unterhalb einer Kernpore befindet	Verlust der subpellikulären Mikrotubuli durch Depolymerisierung, die innere Membran bleibt erhalten Mikrogametozyten zeigen eine deutliche Reduktion der ribosomalen Dichte und sehr wenige Mitochondrien; großer Nukleus mit Kinetochorenkomplex am nukleären Mantel Zahlreiche Mitochondrien, Ribosomen und osmiophile Körperchen in Makrogametozyten, kleiner Kern mit Transkriptionsmaschinerie
Zeitpunkt der Entstehung (in Tagen)	0-2	1-4	2-8	6-10	9-23
Phase im Zellzyklus	G1	G1	G0	G0	G0

Durch den Wirtswechsel vom warmblütigen Vertebraten zum wechselwarmen Invertebraten erhalten die reifen Gametozyten eine Reihe von Signalen, die ihr Ausbrechen aus den Erythrozyten induzieren und somit die Gametenbildung auslösen. Dazu gehören *in vivo* vor allem ein Temperaturabfall von mindestens 5 °C (Billker *et al.*, 1997) und die Anwesenheit von Xanthurensäure im Mückendarm (Billker *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1998). Der Einfluss eines weiteren, unbekanntem Faktors im humanen Serum wird diskutiert (Arai *et al.*, 2001). Es konnte außerdem beobachtet werden, dass eine Erhöhung des pH-Wertes auf über acht zum gleichen Effekt führt (Billker *et al.*, 1997). Da dies jedoch nicht den physiologischen Bedingungen im Mückendarm entspricht, scheint es sich hierbei nur um ein *in-vitro*-Phänomen zu handeln.

Innerhalb von nur zehn Minuten befreien sich die Gametozyten im Mückendarm von der Erythrozytenhülle. Während dieser Zeit rundet sich der Makrogametozyt ab und differenziert sich zum Makrogameten. Der Mikrogametozyt durchläuft dagegen drei Replikationsrunden (Janse *et al.*, 1986, 1988). Er wird dadurch oktoploid und bildet in einem „Exflagellation“ genannten Vorgang acht flagellenartige Mikrogameten. Da diese weder ein Mitochondrium noch einen Apikoplasten besitzen (Sinden *et al.*, 1978), scheinen jene Organellen maternal vererbt zu werden (Vaidya *et al.*, 1993; Creasey *et al.*, 1994). Die bei der Exflagellation entstehenden, heftig flagellenartig schlagenden Mikrogameten stellen rasch Kontakt zu benachbarten, parasitierten und nicht parasitierten Erythrozyten her und heften sich an diese an. Dadurch entstehen rosettenartige Zellkomplexe, die *in vitro* bei 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop gut sichtbar sind (Abb. 1.6). Bisherige Studien zeigten, dass die Adhäsion der Parasiten an Erythrozyten über Glycophorin A und Sialinsäure erfolgt (Templeton *et al.*, 1998). Weitere molekulare Mechanismen zur Ausbildung von Exflagellationskomplexen sind jedoch bisher unerforscht. Ebenso ist Ihre Funktion noch völlig unverstanden.



Abb. 1.6. Exflagellationszentrum bei 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Größenangabe, 12 µm.⁶

Anschließend löst sich der Mikrogamet vom Restkörper des ehemaligen Mikrogametozyten und begibt sich frei beweglich auf die Suche nach einem Makrogameten. Ob dies durch zufällige Bewegungen oder entlang eines durch Makrogameten verursachten Gradienten von Chemoattraktanten geschieht ist noch nicht geklärt (Übersichtsartikel Pradel, 2007).

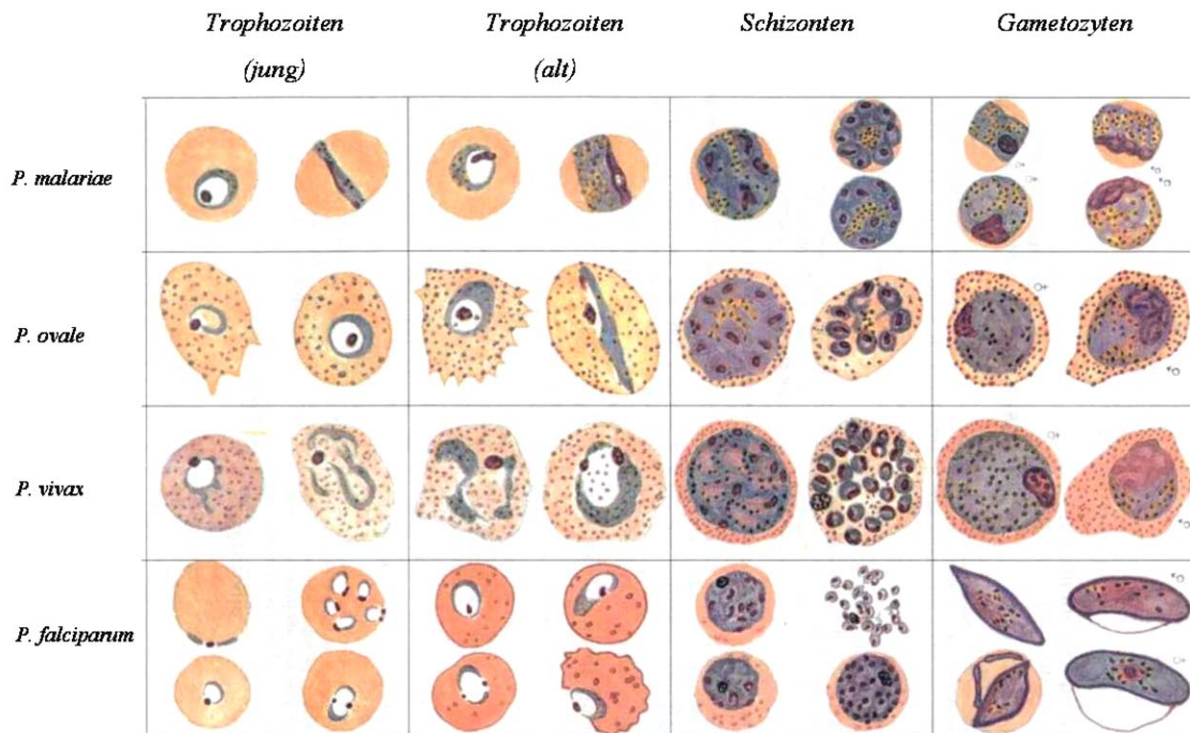


Abb. 1.7. Übersicht der Morphologie der vier verschiedenen humanpathogenen Plasmodienarten.⁷

Treffen Mikro- und Makrogamet aufeinander, kommt es zur Befruchtung, indem die Plasmamembranen der Gameten verschmelzen und der männliche Nukleus samt Axonem in das weibliche Zytoplasma eindringt. Auf die Kernverschmelzung folgt innerhalb der nächsten drei Stunden eine Meiose, die zu einer tetraploiden Zygote führt (Janse *et al.*, 1986); dieser tetraploide Zustand hält insgesamt bis zur Bildung haploider Sporozoiten an. In den anschließenden 24 Stunden differenziert sich die Zygote zu einem für die Mücke infektiösen Ookineten. Dieser ist frei beweglich und besitzt einen Apikalkomplex, der ihm das Eindringen in das Mitteldarmepithel der Mücke ermöglicht, bevor er sich zwischen Epithel und Basallamina einnistet. Das Stadium des Ookineten ist nicht nur den widrigen Lebensbedingungen bei der Verdauung einer Blutmahlzeit ausgesetzt und muss mehrere Barrieren beim Eindringen in das Darmepithel überwinden, sondern kommt ebenso in direkten Kontakt mit Komponenten des Wirtsimmunsystems. Daher stellt es ein so genanntes „bottle neck“ Stadium dar: von ca. 10.000 Gametozyten entwickeln sich nur etwa 1000 zu Ookineten; von diesen können sich wiederum nur weniger als fünf zu Oozysten differenzieren (Sinden, 1999; Sinden und Billingsley, 2001). Diesem hohen Selektionsdruck wirkt der Parasit dadurch entgegen, dass pro Oozyste etwa 1000 Sporozoiten entstehen, die durch die Hämolymphe in die Speicheldrüsen der Mücke wandern und dort für eine Neuinfektion zur Verfügung stehen. Insgesamt wird die Entwicklung von Sporozoiten durch höhere Temperaturen begünstigt und dauert eine bis mehrere Wochen. Der Lebenszyklus verläuft für die vier humanpathogenen

Plasmodienarten zwar sehr ähnlich, dennoch bestehen auffällige morphologische Unterschiede, die in Abb. 1.7 dargestellt sind.

1.3 Impfstoffforschung

1.3.1 Parasitäre Inhibitions- und Immunevasionsmechanismen

Als ein wichtiger Bestandteil der Immunevasion des Malariaerregers wird seine intrazelluläre Lokalisation im Erythrozyten angesehen. Erythrozyten können als kernlose Zellen keine MHC-I-Moleküle produzieren und damit keine parasitären Antigene präsentieren, die zur Abtötung der Zelle durch zytotoxische T-Zellen führen könnten (Übersichtsartikel Komisar, 2007). Eine weitere Vermeidungsstrategie stellt in *P. falciparum* die Variation der PfEMP1-Adhäsionsproteine dar, mit deren Hilfe sich infizierte Erythrozyten an Kapillarendothelien anheften und sich so davor schützen, durch das *Screening* des peripheren Blutes in der Milz herausgefiltert und zerstört zu werden (Angus *et al.*, 1997; Chotivanich *et al.*, 2000, 2002). Zusätzlich beeinflussen Plasmodien die Wirtsabwehr durch Immunsuppression oder präsentieren bevorzugt solche Epitope, die irrelevante Antikörper induzieren oder die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen inhibieren, während relevante Epitope zum Teil nur schwach immunogen sind (Gilbert *et al.*, 1998; Plebanski *et al.*, 1999).

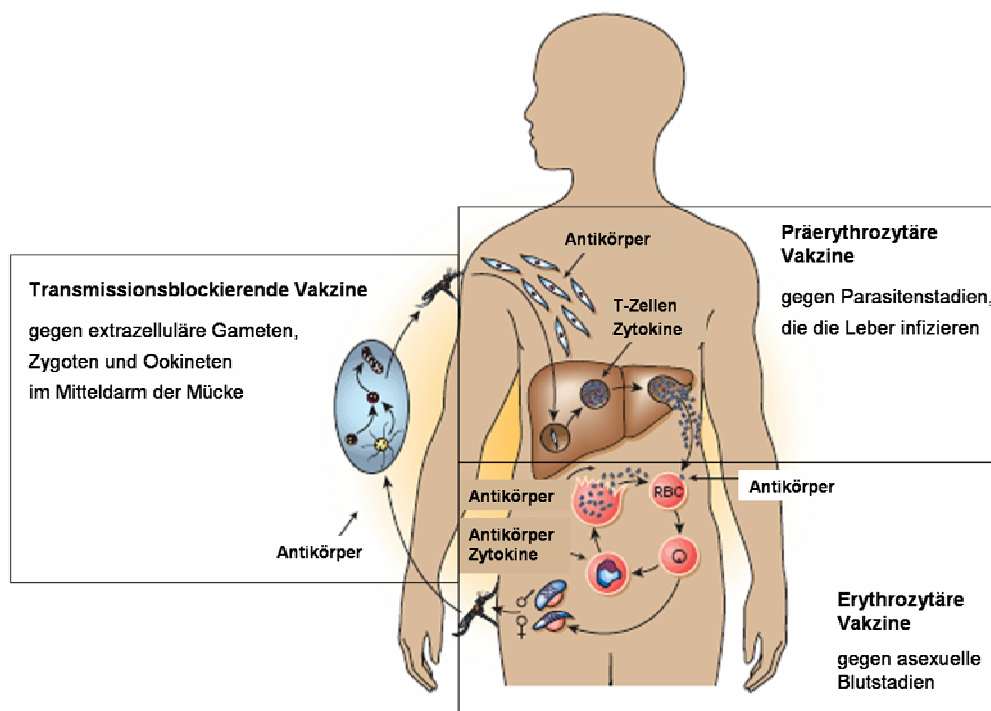


Abb. 1.8. Übersicht der Vakzinstrategien in der Malariaforschung.⁸

Dieser Vielfältigkeit des Parasiten bei der Immunevasion ist es zu zuschreiben, dass trotz intensiver Forschung seit Jahrzehnten bisher kein Malariaimpfstoff die Marktreife erreicht hat. Weitere Probleme der Impfstoffentwicklung stellen die Produktion immunogener rekombinanter Parasitenproteine im Großmaßstab, die Ermittlung der optimalen Adjuvantien und eine damit verknüpfte Überwindung einer zu kurzlebigen Immunantwort dar. Insgesamt lassen sich die unterschiedlichen Vakzinstrategien je nach Angriffsziel in drei Klassen einteilen (Übersichtsartikel Richie und Saul, 2002; Abb. 1.8): Kandidaten für präerythrozytäre, erythrozytäre sowie transmissionsblockierende Impfstoffe sollen in den drei folgenden Abschnitten beschrieben werden.

1.3.2 Präerythrozytäre Vakzine

Präerythrozytäre Vakzine richten sich entweder gegen Sporozoitien oder Leberstadien des Parasiten. Ihr Ziel ist es, eine Malariainfektion zu unterbinden oder die Vermehrung des Parasiten in der Leber zu verhindern, um eine sterile Immunität zu erreichen. Dabei soll der Entwicklungszyklus des Erregers vollständig blockiert und somit einem Krankheitsausbruch vorgebeugt werden. Erfolge konnten bereits mit strahlungsinaktivierten Sporozoitien verzeichnet werden, wodurch es im Menschen zu einer sterilen Immunität gegenüber verschiedenen Parasitenstämmen kam, die zehn Monate Bestand hatte (Hoffman *et al.*, 2002). Da jedoch bei diesem Ansatz lebende Mücken benötigt werden, die bei ihrem Stich die inaktivierten Sporozoitien übertragen, erwies sich diese Strategie als problematisch für die Anwendung im größeren Maßstab (Übersichtsartikel Taylor-Robinson, 2000). Es folgten Experimente mit Oberflächenmolekülen von Sporozoitien wie TRAP (*thrombospondin related adhesion protein*) und CSP (*circumsporozoite protein*) in verschiedenen Kombinationen, sowie mit den beiden Leberstadienantigenen-(LSA)-1 und -3 (Übersichtsartikel Komisar, 2007). Sehr viel versprechend scheint nun ein Impfstoffkandidat namens RTS,S, basierend auf CSP, dem ersten identifizierten Oberflächenprotein von Sporozoitien, zu sein. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus einem C-terminalen Abschnitt von CSP, verschiedenen T-Zell-Epitopen und dem N-Terminus des Hepatitis-B-Oberflächenantigens (Übersichtsartikel Heppner *et al.*, 2005). Eine klinische Studie an ein- bis vierjährigen Kindern in Mozambique zeigte nach drei Impfungen mit RTS,S ein um 37 % vermindertes Risiko an Malaria zu erkranken (Alonso *et al.*, 2004). Aktuell werden weitere Studien von der belgischen Pharmafirma GlaxoSmithKline mit RTS,S in Ghana, Kenia, Sierra Leone, Gabun, Tansania und im Senegal durchgeführt (Dovi, 2006; Aide, 2007).

1.3.3 Erythrozytäre Vakzine

Das Angriffsziel erythrozytärer Vakzine stellen die Blutstadien des Parasiten dar. Da diese für die Krankheitssymptome verantwortlich sind, sollen dadurch sowohl Morbidität als auch Mortalität reduziert werden. Im Fokus dieser Forschung stehen die Antigene AMA-1 (*apical membrane antigen*), MSP-1, -2, und -3 (*merozoite surface protein*) sowie RESA (*ring infected erythrocyte surface antigen*). Nach viel versprechenden Resultaten im Tiermodell zeigten auch erste klinische Studien, dass sowohl AMA-1 als auch MSP-1 und MSP-3 bzw. eine so genannte „Kombination B“ aus MSP-1, MSP-2 und RESA eine spezifische Antikörperproduktion hervorrufen können (Siddiqui *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1991; Etlinger *et al.*, 1991; Narum *et al.*, 2000; Hisaeda *et al.*, 2002; Genton *et al.*, 2002, 2003). So konnte z.B. in Studien der klinischen Phase 1a und 1b unter Verwendung rekombinanter MSP-1-Fragmente eine gute Verträglichkeit des Impfstoffs und eine starke Antikörperproduktion festgestellt werden (Ockenhouse *et al.*, 2006; Withers *et al.*, 2006; Stoute *et al.*, 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden in klinischen Studien der Phasen 1a und 1b an fünf- bis neunjährigen Kindern mit der Kombination B erzielt (Genton *et al.*, 2002, 2003). In Impfstudien anhand von AMA-1 produzierten 92 % der Probanden spezifische Antikörper (Malkin *et al.*, 2005a). Die aktuelle Forschung befasst sich mit den Schwierigkeiten der Antigenvariabilität durch allelische Variation, der rekombinanten Antigenproduktion im Großmaßstab und der Optimierung der Immunantwort durch Adjuvantienkombination (Übersichtsartikel Komsiar, 2007).

1.3.4 Transmissionsblockierende Vakzine

Die Sexualphase des Parasiten stellte lange Zeit kein attraktives Ziel der Malariaforschung dar, da deren Bekämpfung weder dem Wohl der Patienten noch der Ausrottung der Mücke zuträglich zu sein schien. Erst in den letzten zwei Jahrzehnten rückte sie als Angriffsziel für transmissionsblockierende Vakzine (TBV) und Medikamente ins Licht des wissenschaftlichen Interesses (Übersichtsartikel Carter, 2001; Richie und Saul, 2002; Kaslow, 2002; Saul, 2007). Ziel der TBV ist es, im Menschen eine ausreichende Antikörperproduktion gegen sexuelle Parasitenantigene zu aktivieren, um die Parasitenentwicklung in der Mücke zu blockieren. Dies geschieht, wenn der Parasit im Zuge seiner Sexualentwicklung nach einer Blutmahlzeit in der Mücke aus dem Erythrozyten ausbricht und somit die entsprechenden Antigene den Faktoren des Immunsystems aussetzt. Zu diesen Faktoren zählen u. a. spezifisch induzierte, humane Antikörper und Komponenten des Komplementsystems, die ebenfalls mit der Blutmahlzeit in die Mücke gelangen. Diese Faktoren binden idealerweise

ihre zugehörigen Epitope auf den parasitären Sexualstadien im Mitteldarm der Mücke und verhindern dadurch die weitere Entwicklung des Parasiten. Die Folge wäre ein Unterbinden der Weiterverbreitung des Parasiten.

Eine Herausforderung stellt bei dieser Strategie die Identifizierung von Proteinen dar, die nicht nur in der Sexualentwicklung eine essentielle Rolle spielen, sondern als Antigen zusätzlich ausreichend immunogen wirken. Zu den ersten sexualstadienspezifischen Proteinen, die vor etwa zwei Jahrzehnten entdeckt wurden, zählt *Pfs25*, das sich auf der Oberfläche von Makrogameten, Zygoten und Ookineten befindet (Vermeulen *et al.*, 1985, 1986; Kaslow *et al.*, 1988). Zehn Jahre später wurde sein Paralog *Pfs28* identifiziert (Duffy und Kaslow, 1997). *P.-berghei*-Parasiten, bei denen entweder *Pb25* oder *Pb28* ausgeschaltet wurde, sind zwar weiterhin in der Lage die Entwicklung in der Mücke vollständig zu durchlaufen; schaltet man jedoch beide Gene gleichzeitig aus, zeigt sich eine reduzierte Bildung sowie Infektiosität von Ookineten (Tomas *et al.*, 2001). Bei Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken inhibierten Antikörpercocktails gegen *Pfs25* und *Pfs28* die Transmission von *P. falciparum* durch Unterdrückung der Oozystenbildung sogar völlig (Kaslow *et al.*, 1988; Kaslow, 1997; Duffy und Kaslow, 1997). Für erste klinische Studien im Menschen wurde rekombinantes *Pfs25* in Hefezellen hergestellt (Kaslow und Shiloach, 1994; Zou *et al.*, 2003). Da sich jedoch zeigte, dass *Pfs25* alleine keine ausreichende immunogene Wirkung entfaltet, wird derzeit nach geeigneten Adjuvantien zur Optimierung der Antikörperproduktion gesucht. Erste Erfolge wurden in Rhesusaffen erzielt, in denen eine *Pfs25*-induzierte Immunantwort die Transmission des Parasiten in der Mücke vollständig blockierte (Wu *et al.*, 2006). Eine ähnliche Inhibition der Parasitenentwicklung konnte durch Antikörper erreicht werden, die in klinischen Studien der Phase 1 mit dem rekombinanten Protein *Pvs25* aus *P. vivax* gewonnen wurden (Malkin *et al.*, 2005b).

Als sehr viel versprechend gilt heute auch das sexualstadienspezifische Protein *Pfs230*, welches auf der Oberfläche von Gametozyten und Gameten exprimiert wird (Rener *et al.*, 1983; Quakyi *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1993, 1995). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Immunseren gegen dieses Protein die Infektiosität der Mücken gegenüber *P. falciparum* deutlich senken (Williamson *et al.*, 1995). *In vitro* inhibiert die Zugabe von anti-*Pfs230*-Antikörpern zu exflagellierenden Kulturen in Gegenwart von aktivem Serum die Gametenbildung sogar vollständig (Read *et al.*, 1994; Healer *et al.*, 1997; Williamson, 2003). Seine essentielle Rolle bei der Sexualentwicklung scheint *Pfs230* bei der Reifung männlicher Gametozyten auszuüben. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass männliche *Pfs230-knockout*-(KO)-Mutanten zwar exflagellieren, jedoch kaum noch Erythrozyten binden können. Die anschließende reduzierte Oozystenbildung könnte eine Folge der stark eingeschränkten Fähigkeit zur Bildung von Exflagellationszentren sein (Eksi *et al.*, 2006).

Ein weiterer potentieller Kandidat für TBV stellt *Pfs48/45* dar (Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Kocken *et al.*, 1993). Dieses Protein wird sowohl auf weiblichen als auch auf männlichen Gametozyten und Gameten exprimiert und bildet dort zusammen mit *Pfs230* einen Komplex auf der Plasmamembran (Kumar 1987; Kumar und Wizel, 1992). Dabei ist *Pfs48/45* über einen GPI-(*glycosyl phosphatidyl inositol*)-Anker an die Oberfläche des Parasiten gebunden (Kumar und Wizel, 1992). Bei männlichen *Pfs48/45*- und *Pb48/45*-KO-Mutanten war die Motilität und Fähigkeit Makrogameten zu befruchten stark eingeschränkt, während die weiblichen Mutanten ihre volle Fertilität behielten (van Dijk *et al.*, 2001). In Feldstudien zeigte sich außerdem, dass Malariapatienten dazu fähig sind, Antikörper sowohl gegen *Pfs230* als auch gegen *Pfs48/45* zu bilden (Williamson, 2003).

Schwierig an der Thematik der TBV ist der Sachverhalt, dass infizierte Personen aus dieser Impfung keinen direkten Nutzen ziehen; die Parasitenstadien, die die Krankheitssymptome verursachen, können sich dabei ungehindert vermehren. Die ethischen Bedenken, die sich aus diesem „altruistischen“ Aspekt ergaben, führten zu Kritik an der TBV-Strategie. Neuere Studien zeigen jedoch, dass TBV hauptsächlich den Familienangehörigen einer geimpften Person zugute kommen, da Infektionen häufig innerhalb eines Haushalts weitergegeben werden. Somit ist wiederum das Neuinfektionsrisiko für den Geimpften selbst reduziert und der altruistische Effekt relativiert (Übersichtsartikel Sauerwein, 2007). Dennoch würde eine mögliche Alternative zur reinen TBV-Applikation ein Impfstoffcocktail darstellen, bei dem TBV mit Vakzinen gegen präerythrozytäre oder erythrozytäre Stadien kombiniert würden, um einen unmittelbaren Effekt auf den Krankheitsverlauf zu erzielen.

1.4 PfCCp-Proteine: Sexualstadienspezifische Oberflächenproteine mit multiplen Adhäsionsdomänen

1.4.1 Identifizierung und Aufbau

Durch die vollständige Sequenzierung des *P. falciparum*-Genoms (Gardner *et al.*, 2002) und der Genome der Nagermalariaerreger *P. berghei*, *P. yoelii* und *P. chabaudi* (Carlton *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2005) ergaben sich völlig neue Wege, neuartige Angriffspunkte für Malariaimpfstoffe oder -medikamente zu identifizieren. So wurden in *P. falciparum* 1289 Proteine entdeckt, von denen 714 hauptsächlich in asexuellen Stadien, 931 in Gametozyten und 645 Proteine in Gameten exprimiert werden. Es konnten Klassen von konservierten, sekretierten oder membranassoziierten Proteinen gebildet werden (Lasonder *et al.*, 2002). Von besonderem Interesse für TBV waren dabei Proteine mit Adhäsionsdomänen, die an

Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sein könnten. Bei dem Screenen des *P.-falciparum*-Genoms nach Genen, die multiple tier- oder bakterienähnliche, adhäsive, extrazelluläre Domänen kodieren, wurde eine neue Proteinfamilie mit außergewöhnlicher Struktur entdeckt.

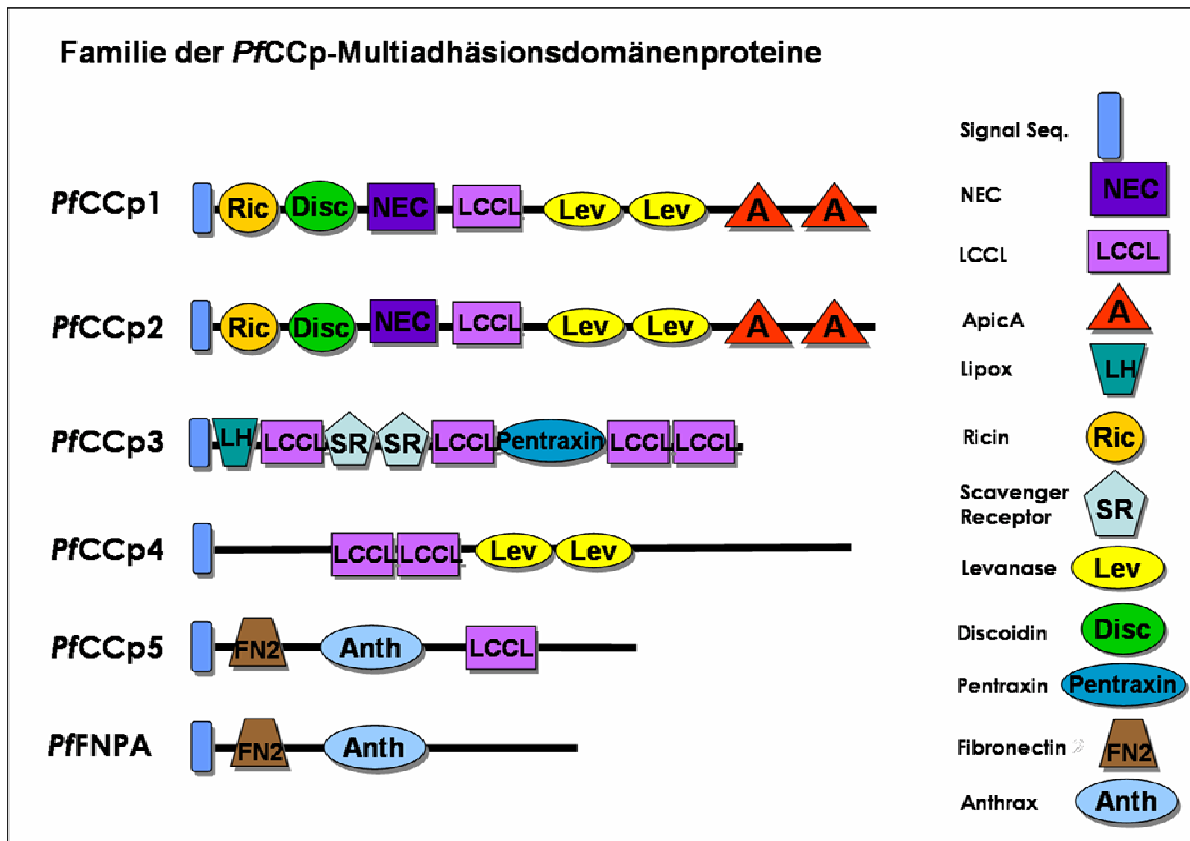


Abb. 1.9. Aufbau der PfCCp-Multiadhäsionsdomänenproteine.⁹

Die sechs Mitglieder dieser Familie verfügen über eine erstaunliche Vielfalt an adhäsiven Modulen und wurden aufgrund einer gemeinsamen *Limulus-Coagulation-factor-C*-(LCCL)-ähnlichen Adhäsionsdomäne PfCCp1 bis PfCCp5 genannt (Delrieu *et al.*, 2002; Lasonder *et al.*, 2002; Dessens *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2004, 2006; Templeton *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2004, Pradel, 2007; Scholz *et al.*, 2005, 2007). Dem sechsten Mitglied, PfFNPA, fehlt zwar die namensgebende Domäne, doch die ausgeprägte Ähnlichkeit zu PfCCp5 führte zur Integration des Proteins in die PfCCp-Familie (Abb. 1.9; Pradel *et al.*, 2004, 2006; Trueman *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2005, 2007). Wie die Domänenarchitektur von PfCCp1 und PfCCp2 unschwer erkennen lässt, handelt es sich bei diesen Proteinen um Schwesterproteine, die durch Genverdopplung entstanden sein könnten. Alle sechs Gene besitzen eine Signalpeptidsequenz, jedoch keine Sequenzen für Transmembrandomänen oder GPI-Anker, was darauf hindeutet, dass die kodierten Proteine sekretiert werden.

Die namensgebende LCCL-Domäne wurde erstmals im Pfeilschwanzkrebs *Limulus* im so genannten Faktor C, dem Zymogen einer sekretierten Serinprotease, entdeckt (Muta *et al.*,

1991). Später wurde sie ebenfalls als Bestandteil des humanen, kochleären Proteins Coch-5b2 und des Lungenreifungsproteins Lgl1 in der Ratte identifiziert (Robertson *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1999). Von diesen drei Proteinen erhielt die Domäne schließlich ihren Namen (Trexler *et al.*, 2000; siehe Markierungen). Sie besteht aus etwa einhundert Aminosäuren mit vier hoch konservierten Cysteinen und besitzt eine einzigartige Struktur aus einer zentralen alpha-Helix, die von zwei beta-Faltblättern umgeben ist (Liepinsh *et al.*, 2001). Häufig tritt die LCCL-Domäne in Verbindung mit anderen Modulen extrazellulärer Proteine auf, die an Protein-, Polysaccharid- oder Lipidbindungen beteiligt sein könnten (Trexler *et al.*, 2000; Liepinsh *et al.*, 2001). Die Neurexin-(NEC)-Domäne wurde ebenso wie das ApicA-Modul erstmals als eigenständiges Motiv in *PfCCp1* und *PfCCp2* beschrieben und nach zwei im Tierreich hoch konservierten Oberflächenproteinen benannt, in denen es enthalten ist: den Neurexinen und Kollagenen (Pradel *et al.*, 2004). Es besitzt zwei Cysteine, die durch Brückenbildung eine tiefe α - β 3-Tasche stabilisieren. Von der ApicA-Domäne ist hingegen nur bekannt, dass es sich um ein Apikomplexa-spezifisches, cysteinreiches Modul handelt (Pradel *et al.*, 2004).

Drei Domänen, die sich unter den *PfCCp*-Proteinen nur in *PfCCp3* befinden, sind die Pentraxin-, SR-(*scavenger receptor*)-, und LH-(Lipoxygenase homologe)-Domänen. Erstere wurde bisher in Proteinen einer akuten Immunantwort samt Agglutination, Komplementaktivierung und Phagozytose nachgewiesen (Bharadwaj *et al.*, 2001; Claudianos *et al.*, 2002; Dessens *et al.*, 2004). Bei der SR-Domäne handelt es sich um ein Motiv, das als kleine, über Disulfidbrücken stabilisierte Strukturkomponente im extrazellulären Teil von membran-gebundenen oder sekretierten Proteinen in einer Vielzahl von Spezies auftritt (Übersichtsartikel Aruffo *et al.*, 1997). Unter ihren etwa 110 Aminosäuren befinden sich sechs konservierte Cysteine, die an der Bindung von Peptidliganden beteiligt zu sein scheinen (Whitney *et al.*, 1995; Delrieu *et al.*, 2002; Claudianos *et al.*, 2002). Die letzte nur in *PfCCp3* vorkommende Domäne, die LH-Domäne, wurde in einer Vielzahl von Membran- oder Lipid-assoziierten Proteinen von Pflanzen, Metazoa und einigen pathogenen Bakterien entdeckt, denen eine Beteiligung an Protein-Lipid-Interaktionen zugeschrieben wurde (Bateman und Sandford, 1999; Delrieu *et al.*, 2002; Claudianos *et al.*, 2002).

Dagegen gilt die Discoidin-(Disc)-Domäne, die sowohl einen Bestandteil von *PfCCp1* als auch von *PfCCp2* darstellt und sich häufig in Eukaryoten findet, ebenso wie die Ricin-(Ric)-Domäne, als Bindungspartner von Polysacchariden (Baumgartner *et al.*, 1998; Ponting und Russell, 2000). Dies scheint ebenfalls für die Levanase-(Lev)-Domäne zu zutreffen, die neben *PfCCp1* und *PfCCp2* auch in *PfCCp4* vorkommt. Die für *PfCCp5* und *PfFNPA* typische Fibronektin-(FN2)-Domäne wurde bisher nur in Vertebraten beschrieben. Dort wird ihr u. a. eine Rolle in der Kollagenbindung nachgesagt (Übersichtsartikel Hornebeck *et al.*, 2005). Ihr folgt in *PfCCp5* und *PfFNPA* ein Motiv, das dem N-terminalen Anteil des *Anthrax-*

protective-Antigens (Anth) entspricht (Pradel *et al.*, 2004). Insgesamt wird all diesen Domänen eine Beteiligung an Protein-Protein-, Protein-Polysaccharid- oder Protein-Lipid-Interaktionen zugeschrieben. Dies deutet darauf hin, dass die *PfCCp*-Proteine entweder an Parasit-Parasit- oder Parasit-Wirts-Interaktionen beteiligt sein könnten (Pradel *et al.*, 2004, 2006).

Orthologe der *PfCCp*-Proteine finden sich auch in anderen Apikomplexa wie z.B. in *P. berghei*, wo sie unter dem Namen *PbLAP* beschrieben wurden (Claudianos *et al.*, 2002; Trueman *et al.*, 2004; Raine *et al.*, 2007), in *Cryptosporidium parvum*, in *Theileria annulata* und in *Toxoplasma gondii* (Dessens *et al.*, 2004). Dies lässt auf eine evolutiv hoch konservierte Funktion dieser Proteine innerhalb der Apikomplexa schließen, wodurch sie zum attraktiven Ziel antiparasitärer Strategien werden (Templeton *et al.*, 2004; Pradel und Templeton, 2006).

1.4.2 Expression und Funktionsanalysen

Erste Versuche zur Charakterisierung der *PfCCp*-Expression zeigten, dass alle *PfCCp*-Proteine sexualstadienspezifisch in Gametozyten exprimiert werden (Delrieu *et al.*, 2002; Pradel *et al.*, 2004, 2006; Scholz *et al.*, 2007). Immunfluoreszenzstudien detektierten *PfCCp1*, *PfCCp2* sowie *PfCCp3* im gesamten Gametozyten in einem punktierten Muster (Abb. 1.10). In ultrastrukturellen Analysen konnte außerdem festgestellt werden, dass *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* in der parasitophoren Vakuole, assoziiert mit der Plasmamembran des Parasiten exprimiert werden.

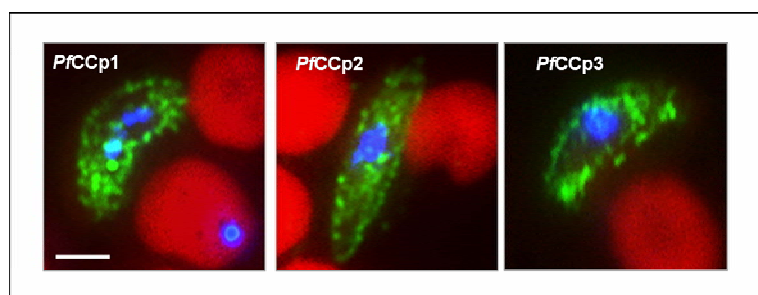


Abb. 1.10. Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*. Indirekte Immunfluoreszenzstudien zeigten ein punktiertes Expressionsmuster der *PfCCp*-Proteine in Grün (Alexa-488), Erythrozyten in Rot (*Evans Blue*) und Kernmaterial in Blau (*Hoechst nuclear stain*). Größenangabe, 2 μm .¹⁰

Für *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* liegt die Vermutung nahe, dass sie während der Gametozytenreifung und der Gametenbildung interagieren (Pradel *et al.*, 2006; Wagner *et*

al., 2006). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass diese drei Proteine *in vitro* bei dem Ausbrechen der Gametozyten aus den Erythrozyten partiell freigesetzt werden (Abb. 1.11A) und den entstehenden Exflagellationskomplex als eine Art Matrix umgeben (Abb. 1.11B).

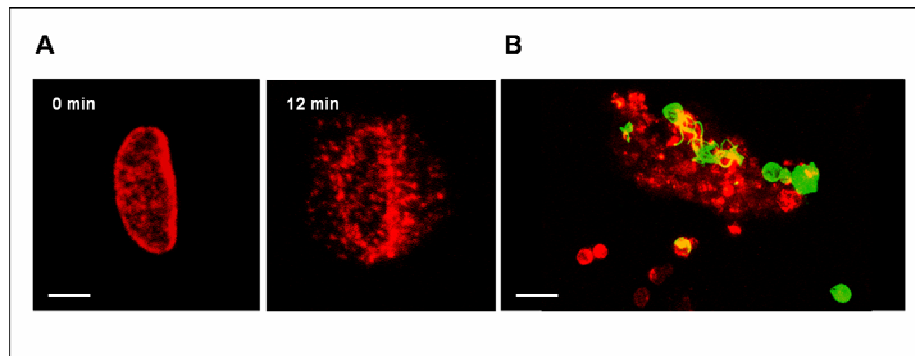


Abb. 1.11. Freisetzung und Matrixbildung am Beispiel von *PfCCp1* während der Gametenbildung. A. Indirekte Immunfluoreszenzstudien an einem aktivierten Gametozyten null und zwölf Minuten nach Aktivierung; in Rot, *PfCCp1* (Alexa-594). Größenangabe, 3 µm. B. Exflagellationskomplex und ihn umgebendes *PfCCp1* in Rot (Alexa-594); männliche Gameten mittels *Pfalpha-Tubulin-II*-Markierung in Grün (Alexa-488). Größenangabe, 20 µm.¹¹

Zur Funktionsanalyse wurden Studien an *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Mutanten durchgeführt. Diese zeigten, dass sowohl *PfCCp2* als auch *PfCCp3* bei der Entwicklung des Parasiten in der Mücke eine essentielle Rolle spielen. Zwar können die Mutanten sich weiterhin befruchten und Zygoten, Ookineten, Oozysten sowie Sporozoiten innerhalb der Oozysten bilden; die Sporozoiten können jedoch nicht mehr in die Speicheldrüsen der Mücke vordringen (Pradel *et al.*, 2004). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Claudianos *et al.* (2002) und Raine *et al.* (2007) bei Untersuchung der *P. berghei*-Orthologe. Sie konnten ebenfalls einen essentiellen Einfluss der *PbCCp/LAP*-Proteine auf die Entwicklung von Oozysten bzw. Sporozoiten beobachten. Zusätzlich postulierten sie eine Rolle der *PbCCp/LAP*-Proteine bei der Regulation des Zellzyklus (Raine *et al.*, 2007).

Bei Studien zur Ko-Expression der *PfCCp*-Proteine konnte in *PfCCp3*-KO-Mutanten eine fehlende Proteinexpression von *PfCCp1* und *PfCCp2* festgestellt werden, obwohl es weiterhin zur regulären Transkriptbildung kam (Pradel *et al.*, 2006). Diese ko-abhängige Expression, sowie die Ko-Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz (Abb. 1.12), führten in unserem Labor zur Hypothese, dass *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* unter Bildung eines Proteinkomplexes interagieren. Der Verlust von *PfCCp3* könnte demnach dazu führen, dass die anderen beiden *PfCCp*-Proteine instabil und letztlich degradiert werden. Erste direkte Interaktionen, die diese Hypothese der Komplexbildung unterstützen, konnten in unserem

Labor durch Affinitätschromatographiestudien unter Verwendung rekombinanter *PfCCp*-Proteine bereits nachgewiesen werden (Wagner *et al.*, 2006).

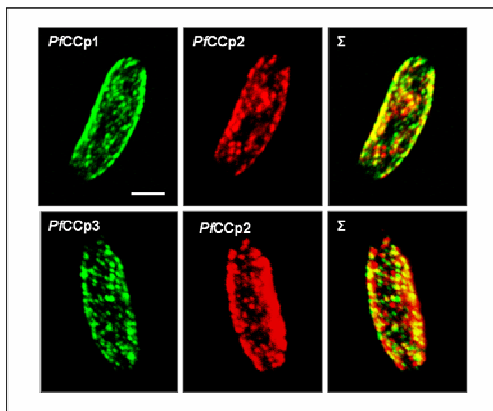


Abb. 1.12. Ko-Lokalisationsstudien von *PfCCp1* und *PfCCp3* (Alexa-488; in Grün) mit *PfCCp2* (Alexa-594; in Rot) mittels Immunfluoreszenz. Σ , Überlagerung der Einzelbilder mit Ko-Lokalisation in Gelb; Größenangabe 3 μm .¹²

Ebenfalls Teil dieser Hypothese ist es, dass nicht nur *PfCCp*-Proteine, sondern auch weitere sexualstadienspezifische Proteine über direkte oder indirekte Interaktionen an der Bildung von Proteinkomplexen innerhalb der parasitophoren Vakuole und um Exflagellationszentren herum beteiligt sind. Obwohl die Funktion von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* noch ungeklärt ist, stellen zumindest *PfCCp2* und *PfCCp3* durch ihre sexualstadienspezifische Expression und ihre essentielle Rolle bei der Parasitenentwicklung in der Mücke potentielle Kandidaten als Komponenten transmissionsblockierender Vakzine dar.

1.5 Ziel der Arbeit

Rasch zunehmende Resistenzentwicklungen des Malariaerregers und das Fehlen eines Impfstoffs gegen Plasmodien verdeutlichen bei einer Mortalitätsrate von bis zu drei Millionen Menschen pro Jahr die Dringlichkeit, effektive Maßnahmen im Kampf gegen Malaria ergreifen zu müssen. Transmissionsblockierende Strategien könnten dabei einen entscheidenden Beitrag leisten, da es ihr Ziel ist, die Ausbreitung der Krankheit zu unterbinden. Für ausgewählte Mitglieder der *PfCCp*-Multiadhäsionsdomänenfamilie konnte wegen ihrer sexualstadienspezifischen Expression und Inhibition der Parasitentransmission in KO-Studien bereits gezeigt werden, dass sie ein viel versprechendes Potential als TBV-Komponenten besitzen. Ihre Funktion ist hingegen noch ungeklärt. Da alle Mitglieder der *PfCCp*-Familie über einen komplexen Aufbau aus multiplen Adhäsionsdomänen verfügen, lag die Vermutung nahe, dass sie eine Rolle bei der Protein-, Lipid- bzw. Polysaccharid-Bindung spielen. Dies könnte entweder bei der Erkennung von Wirtsliganden oder bei der Komplexbildung parasitärer Proteine von Bedeutung sein. Unterstützt wird unsere Hypothese

der Komplexbildung durch die ko-abhängige Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* während der Gametozytogenese, sowie ihre Ko-Lokalisation in Gametozyten. Weitere Indizien stellen die partielle Freisetzung von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* nach Aktivierung der Gametozyten und die Bildung einer matrixähnlichen Struktur dar, welche Exflagellationszentren umgibt.

Wegen des viel versprechenden Potentials von *PfCCp2* und *PfCCp3* im Hinblick auf transmissionsblockierende Strategien lag ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in der funktionalen Charakterisierung des bisher nur hypothetischen Proteins *PfCCp4* während des Lebenszyklus von *P. falciparum*. Ebenso galt es, sein Potential als TBV-Komponente zu evaluieren. Dabei sollte die *PfCCp4*-Charakterisierung durch Analyse des Expressionsmusters während der Sexualstadien des Parasiten mittels RT-PCR, Immunfluoreszenzstudien und Western Blot erfolgen. *PfCCp4*-KO-Studien sollten einen ersten Aufschluss über die Funktion geben. Eigene Vorarbeiten zur Analyse der *PfCCp4*-Expression bestanden in der Klonierung rekombinanter *PfCCp4*-Proteine, deren Expression und Aufreinigung im bakteriellen System, sowie in der Herstellung spezifischer Antiseren. Bei den Funktionsanalysen galt es, an bereits vorhandenen Mutanten das erfolgreiche Ausschalten von *PfCCp4* anhand diagnostischer PCR und Southern Blot zu verifizieren. Proteinexpressionsstudien mittels Western Blot und Immunfluoreszenz-Experimente sollten die Abschaltung der *PfCCp4*-Expression bestätigen. Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken zur Phänotypbestimmung der *PfCCp4*-KO-Mutanten vervollständigten diese Versuchsreihe.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Funktionsanalyse der *PfCCp*-Proteine durch Interaktionsstudien. Experimente zur Klärung direkter Interaktionen innerhalb der *PfCCp*-Familie sollten mittels Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Dafür galt es, rekombinante Proteine zu exprimieren, die einzelnen *PfCCp*-Domänen entsprachen. Ko-Immunpräzipitationen sollten im Anschluss das *PfCCp*-Interaktionsverhalten untereinander und mit anderen sexualstadienspezifischen Proteinen in ihrer nativen Konformation beleuchten. Hier stand hauptsächlich die Suche nach Interaktionspartnern von *PfCCp4* im Fokus. Zur Identifikation der Interaktionspartner galt es, die Präzipitate aus Gametozytenlysaten mittels Western Blot zu analysieren. In einem abschließenden Versuchsansatz sollte das Bindungsverhalten rekombinanter *PfCCp*-Proteine an Sexualstadien von *P. falciparum* beleuchtet werden. Da Gameten nach der Freisetzung der *PfCCp*-Proteine während der Exflagellation reifer Gametozyten als potentielle Bindungspartner eine Schlüsselrolle einnehmen könnten, standen sie im Mittelpunkt dieser Untersuchungen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2.1. Verwendete Geräte und Hersteller

Abzug	Prutscher, Österreich
AccuJet® pro	Brand, Wertheim
Amicon® Ultra-4, Ultra-15 Zentrifugeneinheiten	Millipore, Schwalbach
Autoklav FOMI B 50	Fedegari, Albuzzano, Italien
Binokular FB/WPp4	Zeiss, Oberkochen
Brutschrank Modell 100-800	Memmert, Schwabach
Bunsenbrenner Gasi	Schütt, Göttingen
Chromatographiesäulen PolyPrep®	Bio-Rad, München
Diamantmesser Diatom Ultra 45°	Provac, Oestrich-Winkel
Drucker Stylus Color 740	Epson, Meerbusch
Drucker LaserJet 1200	Hewlett Packard, Böblingen
Eismaschine AS 20	Scotsman, USA
Elektronenmikroskop EM10	Zeiss, Oberkochen

Elektrophoresekammer MIDI 1, MAXI	Roth, Karlsruhe
Elektrophoresekammer Mini-Protean 3	Bio-Rad, München
Entwicklermaschine CURIX 60	Agfa, Köln
Entwicklerkassetten 18 x 24 cm	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Feinwaage GR-200	A & D, Ahrensburg
Fluoreszenzmikroskop Axiolab HBO 50/AC	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop Axiphot	Zeiss, Oberkochen
Folienschweißgerät	Privileg, Fürth
French [®] Press FA078	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Geldokumentation Gel Doc 2000	Bio-Rad, München
Geltrocknungsrahmen 14 x 14 cm	Roth, Karlsruhe
Gefrierschrank Privileg Öko	Privileg, Fürth
Glasküvetten nach Hallendahl	Roth, Karlsruhe
Heizblock Bio TBD-100, TBD-120	Lab-4you, Berlin
Inkubator HERAcell	Heraeus, Hanau
Kanülen Sterican	Braun, Melsungen
Klimakammer	Genheimer, Höchberg
Kühlschrank Privileg Öko	Privileg, Fürth

Konfokales Fluoreszenzmikroskop LSM 510	Zeiss, Oberkochen
Laborglas	Roth, Karlsruhe
Lichtmikroskop Leica DMLS	Leica, Solms
Lichtmikroskop Leitz Laborlux 11	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer	Marienfeld, Mergentheim
Messzylinder	Roth, Karlsruhe
Mikroskopkamera AxioCam	Zeiss, Oberkochen
Mikroskopkamera MP 5000	INTAS, Göttingen
Mikrowelle	Durabrand, Wal-Mart, Arkansas, USA
Mischroller RM 5.40	Karl Hecht KG, Sondheim
Mückeninkubator Model 2015	VWR, West Chester, USA
PCR-Thermocycler primus 25 advanced	Peq-Lab, Erlangen
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim
Pinzetten	Provac, Oestrich-Winkel
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Quarzküvette 1000	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilm Konica A3 Medical Film	Konica, Hohenbrunn

Rotator-Mixer	Labinco, DG Breda, Niederlande
Scanner Perfection 4990 Photo	Epson, Meerbusch
Schüttler SM 30 control	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Sequenzierer ABI Prism [®] 3100	Applied Biosystems, Darmstadt
Speed Vac [®] SC110	Thermo Scientific Savant, Langenselbold
Spritzenfilter 0,2 µm	Roth, Karlsruhe
Spritzen Injekt Luer Solo	Braun, Melsungen
Spülmaschine Mielabor G7783	Miele, Gütersloh
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Hanau
Sterilfilter Steritop [™] 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Stromquelle PowerPac HC High Current Power Supply	Bio-Rad, München
Stromquelle E 835	Consort, Thumhout, Belgien
Tiefkühlschrank HERAfreeze	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Ultramikrotom MT-7000 ULTRA	RMC, Tuscon, USA
Ultraschallgerät Sonoplus HD70	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge Beckmann J2-HC	Beckmann, München

Ultrospec 3100 pro UV/visible Spektrophotometer	Amersham Bioscience, München
UV Stratalinker® 1800	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vakuumpumpe Laboport	KNF, Freiburg
Vortexer Power Mix Model L46	Labinco, Breda, Niederlande
Waagen 440-47N und 440-33	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wärmeplatten OTS 40	medite, Burgdorf
Wasseraufbereitungssystem TKA LAB HP Typ 08.2203	TKA, Niederelbert
Wasserbadinkubator Hecht 3185 WTE	Karl Hecht KG, Sondheim
Wasserbadinkubator Typ WB20	PD Industriegesellschaft, Dresden
Western Blot Apparatur Mini-Trans-Blot	Bio-Rad, München
Wippe Mini-Rocker MR1	Lab-4you, Berlin
Wippe WS-10	Edmund Bühler, Tübingen
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	Becton Dickinson, Falcon, Heidelberg
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Chemikalien von
 - AppliChem, Darmstadt
 - ATCC, Manassas, USA
 - Dianova, Hamburg
 - GE Healthcare/Amersham Bioscience, München
 - Invitrogen/Gibco/Molecular Probes, Karlsruhe
 - Merck/Novagen, Darmstadt
 - Pharmacia/Pfizer, Wien
 - Roth, Karlsruhe
 - Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
 - Sigma/Fluka, Taufkirchen
 - WAK Chemie, Darmstadt

- Einwegmaterialien von
 - BD Falcon, Heidelberg
 - Bio-Rad, München
 - Greiner, Flacht
 - Hartenstein, Würzburg
 - Millipore, Schwalbach
 - Noras, Höchberg
 - Provac, Oestrich-Winkel
 - Roth, Karlsruhe
 - Sarstedt, Nürnberg

- Erythrozytenkonzentrat und humanes Serum der Blutgruppe A+ für die Zellkultur vom Bayerischen Roten Kreuz (BRK), Würzburg
- Peptidantikörper *PfCCp4pt1* und *PfCCp4pt2* von Biogenes, Berlin
- Weibliche, sechs Wochen alte NMRI-Mäuse von Charles River, Sulzfeld
- Zellkulturgas 5 % O₂ Typ 2.5, 5 % CO₂ Typ 2.5 in Stickstoff Typ 3.5 (50 Liter, kein Prüfgas) von Tyczka Industriegase, Würzburg
- Zellkulturmedium RPMI 1640 + 25 mM HEPES + L-Glutamin + Natriumbicarbonat von Invitrogen/Gibco, Karlsruhe

2.1.3 Laborkits und Enzyme

Folgende Kits wurden verwendet:

- *BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems, Darmstadt
- *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*; Roche, Mannheim
- *Epoxy Embedding Medium Kit*; Fluka, Taufkirchen
- *QIAamp Blood Mini Kit*, Qiagen, Hilden
- *QiAprep Spin Miniprep Kit (250)*; Qiagen, Hilden
- *QIAquick PCR Purification Kit (50)*; Qiagen, Hilden
- *QIAquick Gel Extraction Kit (50)*; Qiagen, Hilden
- *QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25)*; Qiagen, Hilden
- *SuperScript[™] First Strand Synthesis System for RT-PCR*; Invitrogen, Karlsruhe

Enzyme und Größenstandards wurden bezogen von:

- Invitrogen, Karlsruhe
- MBI/Fermentas, St. Leon-Rot
- New England Biolabs (NEB), Frankfurt
- Qiagen, Hilden

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tab. 2.2. Puffer und Lösungen

1000 x Ampizillin (0,3 M)	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest}
Blockierungslösung Southern Blot	10 % 10 x Blockierlösung (aus Kit) in Maleinsäurepuffer
Blockierungslösung Western Blot	50 ml 1 x TBS 0,5 g BSA (Fraktion V Albumin) 2,5 g Milchpulver

Cytomix Puffer	8,95 g KCl 0,017 g CaCl 0,76 g EGTA 1,02 g MgCl ₂ 0,871 g K ₂ HPO ₄ 0,68 g KH ₂ PO ₄ 7,08 g Hepes ad 1 l H ₂ O _{bidest} auf pH 7,6 einstellen
Detektionslösung Southern Blot	0,1 M Tris/HCl pH 9,5 0,1 M NaCl
Detergenzpuffer <i>Inclusion-Body-</i> Aufreinigung	20 mM Tris/HCl pH 7,5 2 mM EDTA pH 8,0 200 mM NaCl 1 % Deoxycholicsäure 1 % Nonidet P-40
Elutionspuffer GST-Aufreinigung	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM reduziertes Glutathion
Elutionspuffer 6His/SUMO-Aufreinigung	50 mM Tris/HCl pH 8,0 350 mM NaCl 1 mM beta-Mercaptoethanol 250 mM Imidazol 10 % Glycerin
Equilibrierungspuffer Western Blot	12,1 g Tris 5,8 g NaCl 10,2 g MgCl ₂ ad 1 l H ₂ O _{bidest} auf pH 9,5 einstellen
1000 x Gentamycin (0,1 M)	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest} sterilfiltrieren
Glycerolyte 57	300 mg KCl 517 mg Na ₂ PO ₄ Monohydrat, monobasisch 1242 mg Na ₂ PO ₄ Anhydrat, dibasisch

1000 x Hypoxanthin (0,4 M)	0,05 g/ml in 1 M NaOH sterilfiltrieren
Inkubationslösung IFA	1 x PBS pH 7,4 BSA 0,5 % Saponin 0,01 %
1000 x Kanamycin (0,1 M)	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}
Lösung 1 <i>Dirty Mini</i>	25 mM Tris/HCl pH 8,0 50 mM Glucose 10 mM EDTA pH 8,0 5 mg/ml Lysozym
Lösung 2 <i>Dirty Mini</i>	0,2 N NaOH 1 % SDS
Lösung 3 <i>Dirty Mini</i>	3 M KAc pH 4,8
Lysepuffer Proteinaufreinigung	1,4 ml 5 M NaCl 216 µl 1 M Imidazol 216 µl 20 % IGEPAL 20 µl beta-Mercaptoethanol
Lysepuffer <i>Inclusion-Body</i> -Aufreinigung	50 mM Tris/HCl pH 8,0 0,25 % Sucrose 1 mM EDTA pH 8,0
Maleinsäurepuffer Southern Blot	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl auf pH 7,5 einstellen
Malstat-Reagenz	2 ml 10 % Triton-X-100 2 g L-Lactat 0,66 g Tris 66 mg APAD ad 200 ml H ₂ O _{bidest} auf pH 9,0 einstellen

10 x PAGE-Laufpuffer	29 g Tris 144 g Glycerin 10 g SDS ad 1 l H ₂ O _{bidest}
10 x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O _{bidest} auf pH 7,4 einstellen
10 x PBS für Dialyse	20,1 g Na ₂ HPO ₄ (x 7 H ₂ O) 3,9 g NaH ₂ PO ₄ (x 2 H ₂ O) 150 g NaCl ad 1 l H ₂ O _{bidest} auf pH 7,4 einstellen
PBS-Mix	PBS pH 7,4 BSA 0,5 % Saponin 0,2 %
2 x Probenpuffer	2,5 ml 500 mM Tris/HCl pH 6,8 2 ml Glycerin 4 ml 10 % SDS 0,5 ml 0,1 % Bromphenolblau ad 10 ml H ₂ O _{bidest}
1000 x Pyrimethamin (0,16 mM)	15 mg Pyrimethamin in 500 µl DMSO lösen 13 µl Pyrimethamin/DMSO in 10 ml RPMI <i>incomplete</i> lösen sterilfiltrieren
5 % SDS-Sammelgel	2,4 ml H ₂ O _{bidest} 0,6 ml 30 % Acrylamid 1 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 12 µl 10 % SDS 12 µl 10 % APS 4 µl TEMED

5 % SDS-Trenngel	2,4 ml H ₂ O _{bidest} 0,6 ml 30 % Acrylamid 1 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 12 µl 10 % SDS 12 µl 10 % APS 4 µl TEMED
7 % SDS-Trenngel	5,75 ml H ₂ O _{bidest} 3,5 ml 30 % Acrylamid 5,6 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 150 µl 10 % SDS 120 µl 10 % APS 15 µl TEMED
12 % SDS-Trenngel	3,3 ml H ₂ O _{bidest} 4 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 100 µl 10 % SDS 100 µl 10 % APS 4 µl TEMED
15 % SDS-Trenngel	1,75 ml H ₂ O _{bidest} 7,5 ml 30 % Acrylamid 5,6 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 150 µl 10 % SDS 120 µl 10 % APS 15 µl TEMED
Stoppuffer Western Blot	1,2 g Tris 0,4 g EDTA ad 1 l H ₂ O _{bidest} auf pH 8,0 einstellen
10 x TBS	12,1 g Tris 87,3 g NaCl ad 1 l H ₂ O _{bidest} auf pH 7,5 einstellen
TBS-Milch	3 - 5 % Milchpulver in 1 x TBS
Transferpuffer Western Blot	3,03 g Tris 14,4 g Glycerin 200 ml Methanol ad 1 l H ₂ O _{bidest}

TSE	20 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM NaCl 50 mM EDTA
Waschpuffer <i>Inclusion-Body</i> -Aufreinigung	0,5 % Triton-X-100 1 mM EDTA pH 8,0
Waschpuffer Southern Blot	0,3 % Tween 20 in Maleinsäurepuffer
Waschpuffer 3 Proteinaufreinigung	50 mM Tris/HCl pH 8,0 350 mM NaCl 1 mM beta-Mercaptoethanol 10 % Glycerin
Waschpuffer 4 Proteinaufreinigung	50 mM Tris/HCl pH 6,4 1 M NaCl 1 mM beta-Mercaptoethanol 10 % Glycerin 0,1 % Laurylsarcosine
Waschpuffer 5 Proteinaufreinigung	50 mM Tris/HCl pH 8,0 350 mM NaCl 1 mM beta-Mercaptoethanol 10 % Glycerin 60 mM Imidazol
1 mM Xanthurensäure	0,05 g Xanthurensäure 1 ml 0,5 M NH ₄ OH 243 ml H ₂ O _{bidest}

2.1.5 Medien und Agarplatten

Tab. 2.3. Medien und Agarplatten

A+-Serum, human, für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	Serum sterilfiltrieren, in 50-ml-Reaktionsgefäße aliquotieren und im Wasserbad bei 55 °C 50 Minuten hitzeinaktivieren; Lagerung bei -20 °C
---	--

A+-Erythrozyten (50 % Hämatokrit) für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	Erythrozytenkonzentrat zu je 30 ml aliquotieren, zehn Minuten bei 1300g zentrifugieren; Überstand verwerfen, auf 50 ml mit RPMI- <i>incomplete</i> auffüllen, zentrifugieren; Waschvorgang zweimal wiederholen; Erythrozyten 1:1 in RPMI- <i>incomplete</i> aufnehmen; Lagerung maximal vier Wochen bei 4 °C
LB-Agar	<p>10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar ad 1 l H₂O_{bidest}</p> <p>Autoklavieren und Antibiotika erst zugeben, wenn die Lösung auf unter 50 °C abgekühlt ist.</p>
LB-Medium	<p>10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l H₂O_{bidest}</p>
RPMI- <i>incomplete</i>	<p>10,43 g RPMI-1640-Pulver 5,94 g Hepes 0,05 g Hypoxanthin ad 1000 ml H₂O_{bidest}</p> <p>sterilfiltrieren</p>
Selektionsmedium für <i>P.-falciparum</i> -KO-Parasiten	<p>500 ml RPMI 1640 50 ml humanes A+-Serum 550 µl 1000 x Hypoxanthin 550 µl 1000 x Gentamycin 550 µl 1000 x Pyrimethamin</p>
SOC-Medium	<p>20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml 0,25 M KCl 5 ml 2 M MgCl₂ 20 ml 1 M Glucose ad 1 l H₂O_{bidest}</p>

Zellkulturmedium für Wildtyp (WT) <i>P. falciparum</i>	500 ml	RPMI 1640 + 25 mM HEPES + L-Glutamin + Natriumbicarbonat
	50 ml	humanes A+-Serum
	550 µl	1000 x Hypoxanthin
	550 µl	1000 x Gentamycin

2.1.6 Zelllinien und Bakterienstämme

Verwendete Zelllinien:

- *Plasmodium falciparum* WT NF54: Pyrimethamin-sensitiv, 1982 in den Niederlanden isoliert (Ponnudurai *et al.*, 1981)
- *Plasmodium falciparum* PfCCp1-KO-Klon 5YE2 (C. Moreira, unveröffentlichte Daten): Pyrimethamin-resistent, auf Basis des Vektors pHHT-TK durch homologe Rekombination mittels *double crossover* hergestellt (Reed *et al.*, 2000; Duraisingh *et al.*, 2002)
- *Plasmodium falciparum* PfCCp2-KO-Klone D11H, F1D (Pradel *et al.*, 2004): Pyrimethamin-resistent, auf Basis des Vektors pDT-Tg23 (siehe Kapitel 2.1.7)
- *Plasmodium falciparum* PfCCp3-KO-Klone H3D, I9C (Pradel *et al.*, 2004): Pyrimethamin-resistent, auf Basis des Vektors pDT-Tg23 (siehe Kapitel 2.1.7)

Verwendete Bakterienstämme:

- *E.-coli*-Proteinexpressionszellen BL21-CodonPlus[®]-(DE3)-RIL von Stratagene: Genotyp *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS* (r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*]
- *E.-coli*-Transformationszellen OneShot[®]-Top10-Competent-Cells von Invitrogen: Genotyp F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

2.1.7 Plasmide

pSUMO/pSMT3: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Chris Lima (New York, USA): *Low-copy-T7*-Expressionsvektor mit Kanamycinresistenz, N-terminalem 6His-Peptid und SUMO-Chaperonsequenz auf Basis des Plasmids pET28b von Novagen (Abb. 2.1).

pGex-4T-1: *High-copy*-Expressionsvektor mit Ampizillinresistenz und GST-Peptid von Amersham Bioscience (Abb. 2.2).

pDT-Tg23: Vektor zur homologen *single-crossover*-Rekombination bei der Herstellung von *P. falciparum*-KO-Parasiten (Wu *et al.*, 1996). Selektionskassette mit Dihydrofolatreduktase-(DHFR)-Gen von *Toxoplasma gondii* verleiht Resistenz gegenüber Pyrimethamin. Basierend auf dem Vektor pBluescript-II-SK von Stratagene besitzt der Vektor zusätzlich ein Ampizillinresistenzgen, *low copy* (Abb. 2.3).

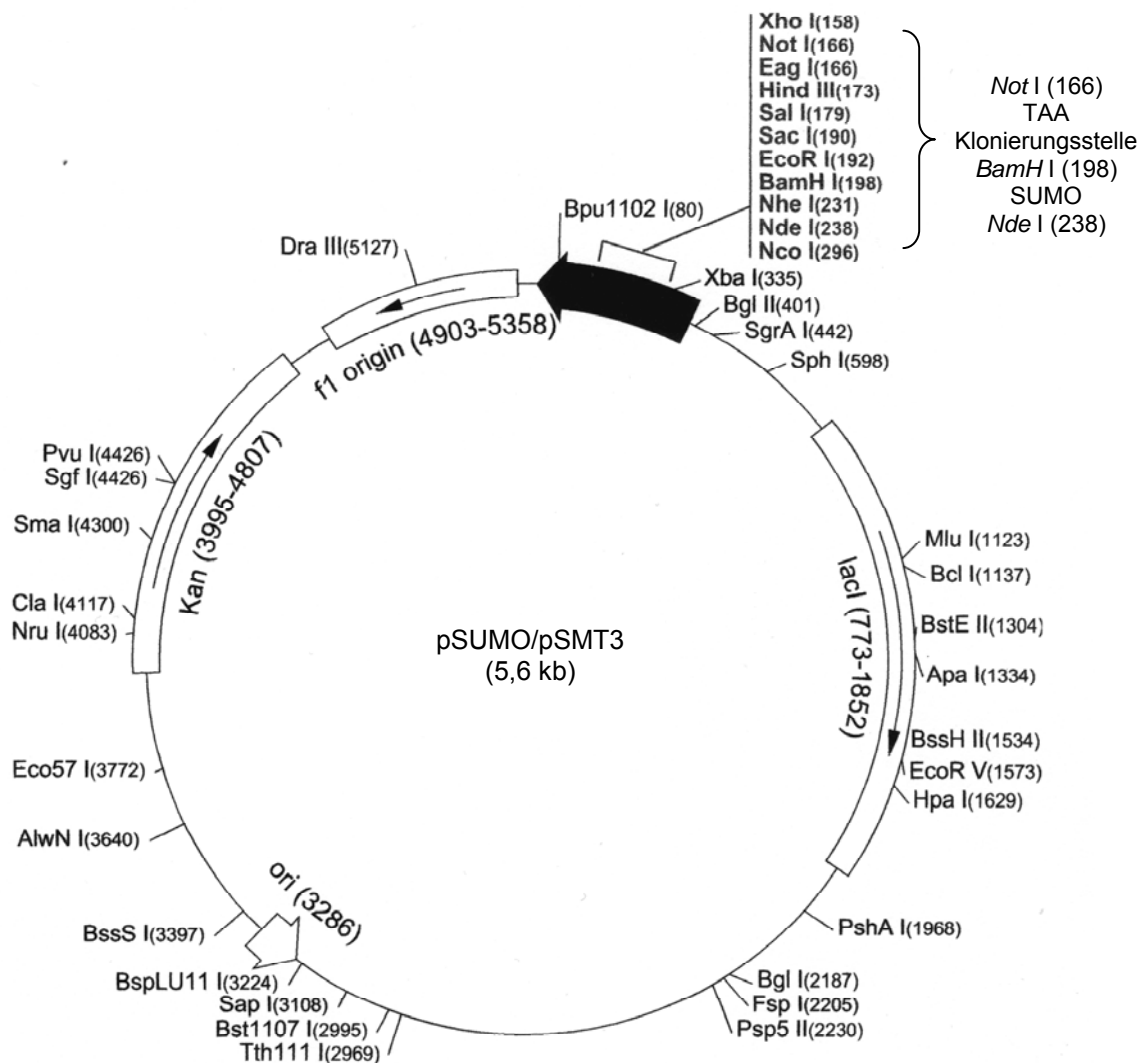


Abb. 2.1. pSUMO/pSMT3-Expressionsvektor mit multipler Klonierungsstelle.¹³

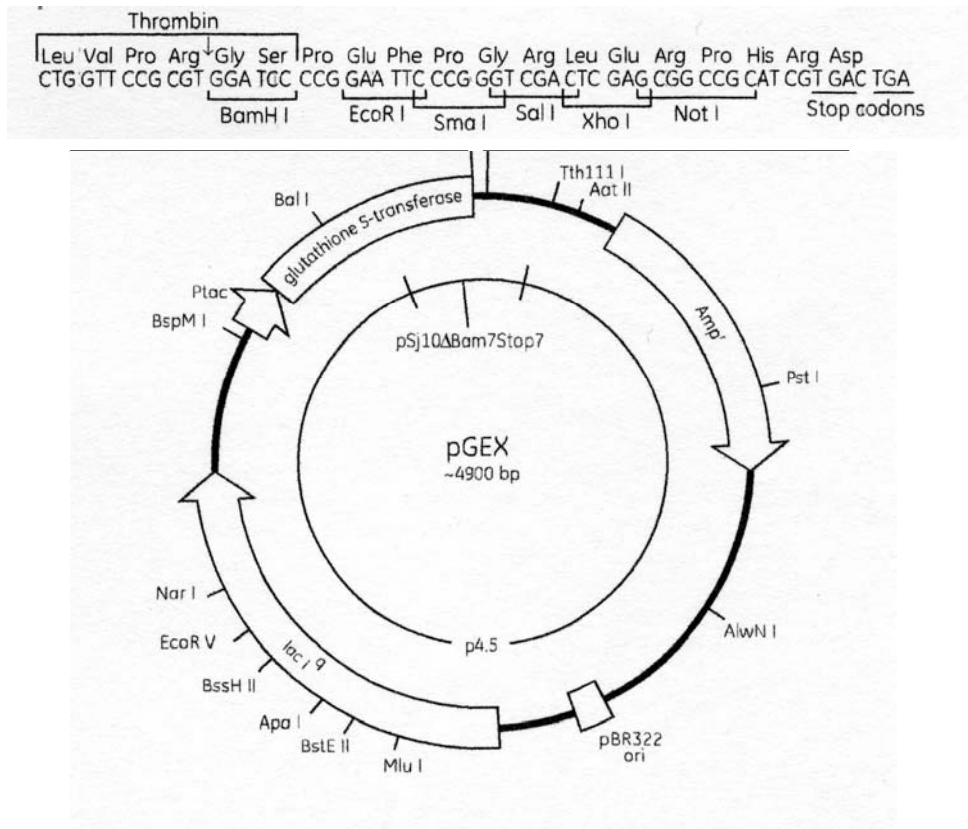


Abb. 2.2. pGex-4T-1-Expressionsvektor mit multipler Klonierungsstelle.¹⁴

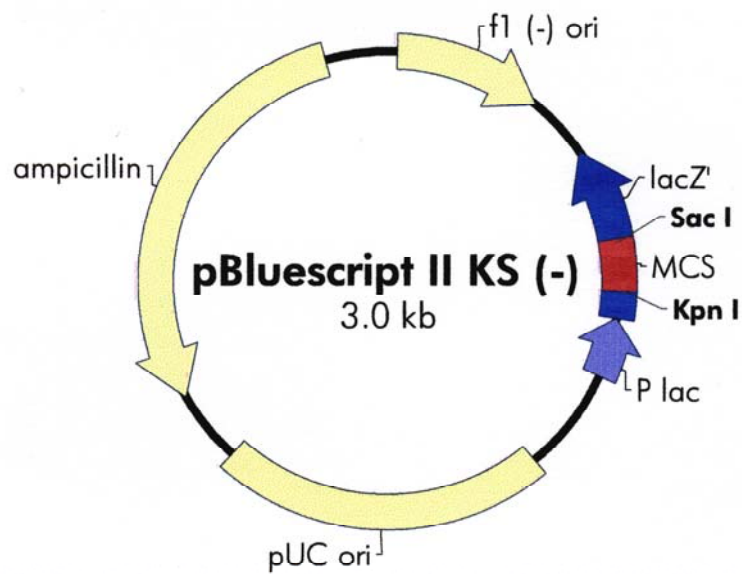


Abb. 2.3. Vektor pBluescript als Basis des KO-Vektors pDT-Tg23.¹⁵

2.1.8 Oligonukleotide

Tab. 2.4. Oligonukleotide

Zur Herstellung der rekombinanten Proteine und des <i>PfCCp4</i>-KO-Konstrukts	
<i>PfCCp4rp1 Sense-BamH I</i>	aa GGATCC tcg ttc gat aat gga aga
<i>PfCCp4rp1 Antisense-Not I</i>	tt GCGGCCGC tta acc aca ctc ttc ata tat
<i>PfCCp4rp2 Sense2-BamH I</i>	aa GGATCC acc tat caa agt aga gac
<i>PfCCp4rp2 Antisense2-Not I</i>	tt GCGGCCGC tta taa aac gac tgg ggg tgt
<i>PfCCp4rp3 Sense-BamH I</i>	aa GGATCC atg ccc gaa caa atc att
<i>PfCCp4rp3 Antisense-Not I</i>	tt GCGGCCGC tta agg cat att ctt gat gtc
<i>PfCCp4rp4 Sense-BamH I</i>	aa GGATCC gat gat acc att gtt gct
<i>PfCCp4rp4 Antisense-Not I</i>	tt GCGGCCGC tta ttt gtt tcc tac tgt tcc
<i>PfCCp4rp5 Sense-BamH I</i>	aa GGATCC gga ttt gga gtc aat cat
<i>PfCCp4rp5 Antisense-Not I</i>	tt GCGGCCGC tta aag acc tag tgt acc caa
<i>PfCCp4KO-1 Sense Sac II</i>	at CCGCGG tgt gct caa ata gct ggg
<i>PfCCp4KO-1 Antisense Not I</i>	ta GCGGCCGC tta ttg ccc ttg ttc tat acc
<i>PfCCp4KO-SS-1 Sense</i>	gcc acc gat gaa tgt gat
<i>PfCCp4KO-SS-1 Antisense</i>	tta agg cac ata ccg ttg
Für RT-PCR und Sequenzierung	
<i>PfCCp4RT1 Sense</i>	atg ccc ga caa atc att
<i>PfCCp4RT1 Antisense</i>	tgc tga ggc gca tat act
<i>PfCCp4RT2 Sense</i>	gga aca gta gga aac aaa
<i>PfCCp4RT2 Antisense</i>	atg att gac tcc aaa tcc
<i>PfCCp4-Seq 1 Sense</i>	cca agt ggt agg ttt tgt
<i>PfCCp1 RT1 Sense</i>	gaa gat gga gat ggg aaa
<i>PfCCp1 RT1 Antisense</i>	gct gtt caa att ccc atc
<i>PfAMA-1 RT1 Sense</i>	gga tta tgg gtc gat gga
<i>PfAMA-1 RT1 Antisense</i>	gat cat act agc gtt ctt
<i>Pfs25 RT2 Sense</i>	cca tgt gga gat ttt tcc
<i>Pfs25 RT1 Antisense</i>	gca ttt ggt ttc tcc
<i>Pfs28 RT1 Sense</i>	cgt tga ata agg ctc ggg
<i>Pfs28 RT1 Antisense</i>	ttg cag gat cta cta tac
M13R	gga aac agc tat gac gat gat
T3	tta acc ctc act aaa ggg

pET28b <i>Sense</i> 2	tat agg gga att gtg agc
pET28b <i>Reverse</i> 2	tca aga ccc gtt tag agg
pGex <i>Sense</i>	tgg acc caa tgc ctg g
pGex <i>Antisense</i>	acg tga ctg gca tgg c

2.1.9 DNA- und Proteingrößenstandards

DNA-Molekulargewichtsstandards:

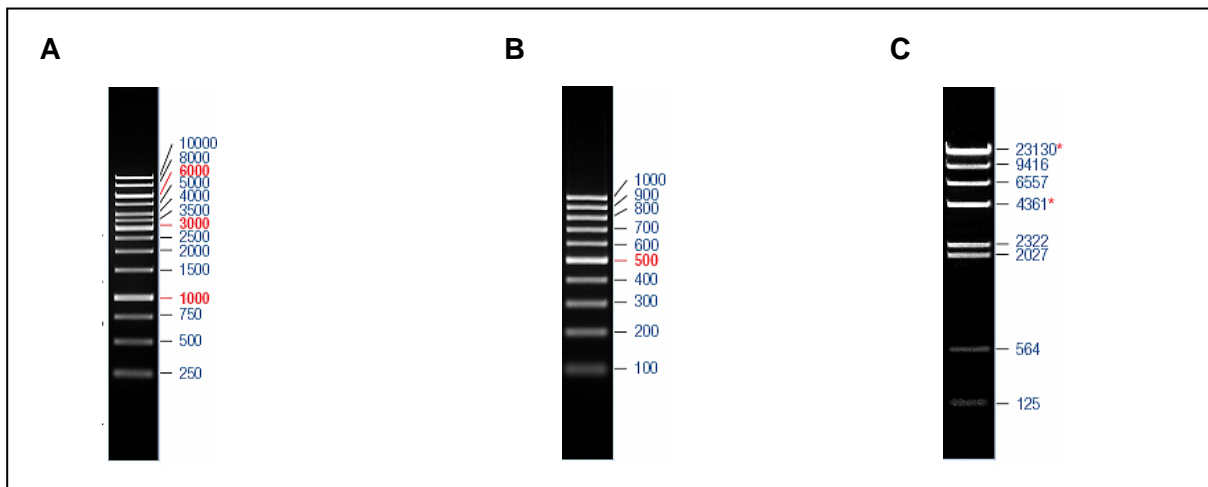


Abb. 2.4. DNA-Molekulargewichtsstandards von MBI/Fermentas. A. *GeneRuler™*-1-kb-DNA-Leiter, B. *GeneRuler™*-100-bp-DNA-Leiter, C. λ-DNA/*HindIII*-Leiter; Größenangaben in bp.¹⁶

Protein-Molekulargewichtstandards:

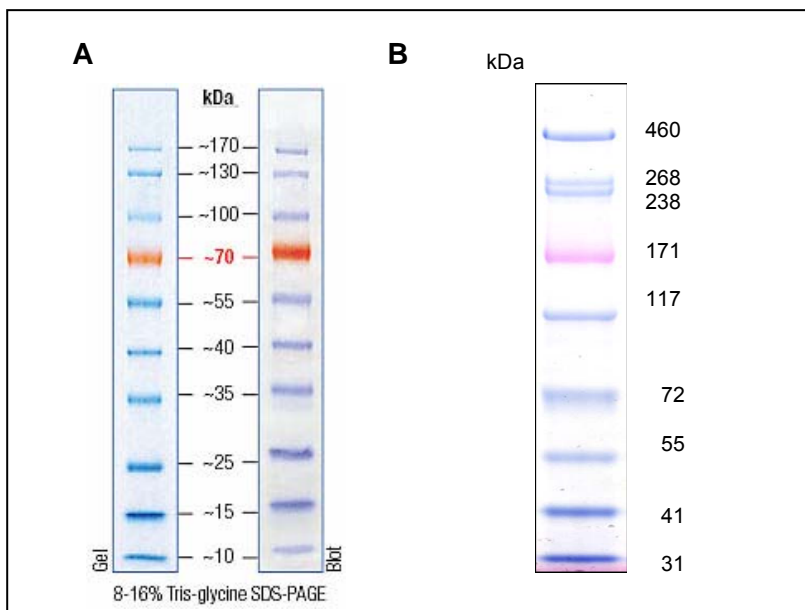


Abb. 2.5. Proteingrößenstandards. A. *Page-Ruler™*-pre-stained-Proteinstandard von MBI/Fermentas, B. *HiMark™*-Prestained-Proteinstandard von Invitrogen.¹⁷

2.1.10 Antikörper

Tab. 2.5. Antikörper

Antikörper	Immunisiertes Tier	Verdünnung		Herkunft
		Western Blot	IFA	
Anti- <i>Pf</i> CCp1/1rp1 polyklonal	Maus	1:200	1:100	AG Pradel
Anti- <i>Pf</i> CCp2/2rp3 polyklonal	Maus	1:200	1:100	AG Pradel
Anti- <i>Pf</i> CCp3/SR polyklonal	Maus	1:100	1:100	T. J. Templeton
Anti- <i>Pf</i> CCp3/3rp3 polyklonal	Maus	1:100	1:100	AG Pradel
Anti- <i>Pf</i> CCp4/4rp1 polyklonal	Maus	-	1:50	AG Pradel
Anti- <i>Pf</i> CCp4/4rp3 polyklonal	Maus	1:20	-	AG Pradel
Anti- <i>Pf</i> CCp4/pt1 polyklonal	Kaninchen	-	1:50	Biogenes
Anti- <i>Pf</i> CCp4/pt2 polyklonal	Maus	-	unverdünnt	Biogenes
Anti- <i>Pfs</i> 230 polyklonal	Maus	1:100	1:100	K. Williamson, Chicago
Anti- <i>Pfs</i> 48/45 polyklonal	Maus	1:100	n.v	K. Williamson, Chicago
Anti- <i>Pfs</i> 16 polyklonal	Maus	1:100	n.v	K. Williamson, Chicago
Anti-MR5 polyklonal	Maus	-	1:200	K. Williamson, Chicago
Anti- <i>Pf</i> 39 polyklonal	Maus	1:100	1:100	AG Pradel
Anti- <i>Pf</i> Peg3 polyklonal	Ratte	1:100	1:100	P. Alano, Rom
Anti-GST polyklonal	Maus	1:100	1:100	AG Pradel
Anti-GST polyklonal	Ziege	1:4000	-	GE Healthcare
Anti-His polyklonal	Maus	1:100	1:100	AG Pradel
Anti-His monoklonal	Maus	1:5000	-	Pharmacia
Anti- <i>Pfs</i> 25 polyklonal	Kaninchen	1:500	1:1000	ATCC
Anti- α -Tubulin-II polyklonal	Kaninchen	1:500	1:1000	ATCC
Anti- <i>Pf</i> MSP-1, polyklonal	Kaninchen	-	1:500	ATCC
Neutrales Mausserum	Maus	1:100	1:100	AG Pradel
Neutrales Ziegenserum	Ziege	1:100	1:100	Sigma

Anti-Maus IgG Alexa-488	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Anti-Maus IgG Alexa-594	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Anti-Rabbit IgG Alexa-488	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Anti-Rabbit IgG Alexa-594	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Anti-Rabbit IgG Alexa-488	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Anti-Maus IgG alkal. Phosphatase	Ziege	1:5000	-	Sigma
Anti-Ziege IgG alkal. Phosphatase	Kaninchen	1:7000	-	Sigma
Anti-Ratte IgG alkal. Phosphatase	Ziege	1:5000	-	Sigma
Anti-Kaninchen IgG alkal. Phosphatase	Ziege	1:5000	-	Sigma
12-nm-Kolloidalgold anti-Maus IgG	Ziege	1:10	-	Dianova

2.1.11 PlasmoDB-Identifizierungsnummern

Tab. 2.6. Verwendete Proteine und ihre zugehörigen PlasmoDB-Identifizierungsnummern

<i>Pf39</i>	PF11_0098
<i>Pfalpha-Tubulin-II</i>	PFD1050w
<i>PfCCp1</i>	PF14_0723
<i>PfCCp2</i>	PF14_0532
<i>PfCCp3</i>	PF14_0067
<i>PfCCp4</i>	PFI0185w
<i>PfCCp5</i>	PFA0445w
<i>PfFNPA</i>	PF14_0491
<i>PfPeg3</i>	PFL0795c
<i>PfMR5</i>	PFB0400w
<i>Pfs230</i>	PFB0405w
<i>Pfs25</i>	PF10_0303

Pfs16	PF11_0318
Pfs48/45	PF13_0247

2.1.12 Verwendete Computerprogramme

- Adobe® Acrobat Reader 7.0
- Adobe® Photoshop CS
- BioEdit *sequence alignment version 7.0.5.3*
- NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>)
- Microsoft® Excel 2002
- Microsoft® Word 2002
- Microsoft® Powerpoint 2002

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische und zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Desinfizieren und Sterilisieren

Grundlage aller mikrobiologischen Arbeitsmethoden ist das Entfernen oder Inaktivieren von unerwünschten Keimen, z.B. durch Sterilisation. Je nach Art des Sterilisationsgutes gab es verschiedene Verfahren:

Autoklavieren:

Nichtflüchtige, hitzestabile Medien, Lösungen und Materialien wurden im Autoklaven sterilisiert. Hierbei wurden Mikroorganismen 20 Minuten durch hohen Druck (1,1 bar) und einer daraus resultierenden Erhöhung der Siedetemperatur des Wassers auf ca. 120 °C abgetötet.

Sterilfiltrieren:

Substanzen, die nicht hitzestabil waren, wurden mittels Filtration durch Steritop™-Filter oder einfache Spritzenfilter sterilisiert. Die Porengröße der Filter betrug 0,22 µm.

Sterile Arbeiten wie die Zellkultur von *P. falciparum* wurden unter der Sterilbank HERAsafe durchgeführt. Parasitenabfälle wurden mit einer 13%igen Lösung von Natriumhypochlorit dekontaminiert.

Eine weitere, jedoch weniger effektive Möglichkeit, Mikroorganismen zu entfernen, stellt die Desinfektion dar. Darunter versteht man die Verringerung von Krankheitserregern durch physikalische Verfahren wie Abflammen am Bunsenbrenner oder durch chemische Verfahren wie Desinfektionsmittel. Sie wirken u. a. durch die Veränderung von Biomembranen mittels Alkoholen oder durch Oxidation. Bei den hier beschriebenen Arbeiten wurde zur Desinfektion von Gebrauchsgegenständen 70%iger Ethanol verwendet oder es wurde am Bunsenbrenner abgeflammt.

2.2.1.2 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte in LB-Medium unter Zugabe von Antibiotika entsprechend der Selektionsbedingungen bei 37 °C für Plasmidpräparationen bzw. bei Raumtemperatur (RT) für Proteinexpressionen. Die Schüttelgeschwindigkeit betrug 180-220 Umdrehungen pro Minute. Auf Agarplatten ausgestrichene Bakteriensuspensionen wurden über Nacht bei 37 °C kopfüber im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.3 Konservierung von Bakterienkulturen

Kurzfristige Konservierung

Bakterienklone auf Agarplatten sowie Bakteriensuspensionen lassen sich bei 4 °C für etwa vier Wochen aufbewahren, sofern sie nicht für die Proteinexpression verwendet werden. Für diesen Fall wurden die Platten nicht länger als zwei Tage bei 4 °C gelagert, da mit Zunahme der Lagerdauer die Effektivität der bakteriellen Proteinexpression deutlich nachließ.

Langfristige Konservierung

Hierfür wurden die gewünschten Einzelkolonien gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Medium/Antibiotikum kultiviert. Für die Stammkultur wurden anschließend 800 µl dieser Bakteriensuspension mit 200 µl einer 80%igen, sterilen Glycerinlösung vermischt und in Kryogefäßen bei -80 °C gelagert.

2.2.1.4 Transformation kompetenter Bakterienstämme

Unter Transformation versteht man den Vorgang der Genübertragung, bei dem isolierte DNA in einen Akzeptororganismus eingeführt wird. Bakterien, die unbehandelt in der Lage sind DNA aufzunehmen, bezeichnet man als natürlich kompetent. Nicht natürlich kompetenten Bakterien kann künstlich Kompetenz verliehen werden. Standardisierte Methoden umfassen die Erzeugung von Kompetenz z.B. durch Behandlung mit Kalziumchlorid. In dieser Arbeit wurden ausschließlich kommerziell erwerbliche, chemisch kompetente Bakterien verwendet: BL21-CondonPlus[®]-(DE3)-RIL-Zellen für die Proteinexpression, OneShot[®]-Top10-Zellen für Plasmidpräparationen (siehe Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.2.8).

Für die Transformation des gewünschten Plasmids wurden 20 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µl Ligationsansatz vermischt. Der Ansatz wurde anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor er 30 Sekunden lang bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen wurde. Dabei öffnen sich die Bakterienmembranen und ermöglichen der DNA das Eindringen in die Zelle. Danach folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis, wodurch sich die Membranporen wieder schließen konnten. Hiernach wurden 200 µl SOC-Medium hinzu gegeben und die Kultur mindestens eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert, wobei es zur Ausbildung der gewünschten Resistenz kam. Das Ausplattieren erfolgte auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum, die Inkubation über Nacht bei 37 °C.

2.2.1.5 Kultivierung und Konservierung von *Plasmodium falciparum*

Kultivierung asexueller *P.-falciparum*-Stadien

Seit Trager und Jensen 1976 die Methode zur *in-vitro*-Kultivierung erythrozytärer Stadien von *P. falciparum* entwickelten, lässt sich der Malariaerreger im Labor verhältnismäßig einfach kontinuierlich vermehren. WT-Parasiten wurden dafür in 25-cm²-Zellkulturflaschen in 5 ml Zellkulturmedium mit einem Hämatokritwert von 5 % bei 37 °C inkubiert. Der Medien-austausch erfolgte täglich durch Absaugen des Überstandes oberhalb der sedimentierten Erythrozyten und Zugabe von 5 ml frischem, vorgewärmtem Zellkulturmedium. Ein zehnssekündiges Begasen mit 5 % O₂ und 5 % CO₂ in Stickstoff schloss jede Passage oder Probenentnahme ab. Um in der kontinuierlichen Kultur Dichtestress bzw. eine Differenzierung zu Sexualstadien zu verhindern, wurden die Zellen bei Erreichen einer Parasitämie von 1-2 %, etwa alle drei Tage, 1:5 bis 1:10 verdünnt. Die Zelldichte wurde durch Giemsa-gefärbte Blutaussstriche (siehe Kapitel 2.2.1.6) ermittelt.

Kultivierung sexueller *P.-falciparum*-Stadien

Zu den sexuellen Stadien von *P. falciparum*, die sich *in vitro* kultivieren lassen, zählen Gametozyten, Gameten und Zygoten. Zur Etablierung einer Gametozytenkultur wurden 3 ml asexuelle Parasiten (1-2 % Parasitämie) in eine 75-cm²-Zellkulturflasche überführt, die 20 ml Zellkulturmedium und Erythrozyten der Blutgruppe A+ entsprechend einem Hämatokritwert von 5 % enthielt. Das verbrauchte Medium wurde täglich durch 20 ml frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt, gefolgt von 20 Sekunden Begasen. Eine konstante Temperatur von 37 °C ist für die erfolgreiche Kultivierung von Gametozyten unerlässlich, weshalb bei Arbeiten unter der Sterilbank eine Wärmeplatte zum Einsatz kam. Die Bildung von Gametozyten wurde anhand von Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen verfolgt (siehe Kapitel 2.2.1.6). Meist ließen sich nach 14-20 Tagen hauptsächlich Gametozyten des Stadium V beobachten. Zur Überprüfung ihres Reifegrades wurden Exflagellationstests durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1.7). Für die Gewinnung von Gameten bzw. Zygoten wurden reife Gametozyten mit A+-Serum oder 0,1 mM Xanthurensäure aktiviert und 30 Minuten bzw. über Nacht inkubiert. Die Proben wurden entweder direkt für Immunfluoreszenzstudien und elektronenmikroskopische Analysen verwendet oder für Interaktionsstudien bzw. Western-Blot-Experimente aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.8, 2.2.1.10, 2.2.1.11, 2.2.3.5 und 2.2.3.6).

Kultivierung mückenspezifischer Stadien von *P. falciparum*

Die weiteren Parasitenstadien - Ookineten, Oozysten und Sporozoiten - entwickeln sich ausschließlich in der Mücke. Für diese Form der Zellkultur wird in Deutschland ein Insektarium auf S3**-Ebene benötigt, wie es im Moment am Institut für Molekulare Infektionsbiologie errichtet wird. Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Analysen mückenspezifischer Stadien zur Phänotypbestimmung von *PfCCp4*-KO-Parasiten wurden im Insektarium des Weill Medical College (WMC), Cornell Universität, New York durchgeführt. Für die Membranfütterungen von *Anopheles-stephensi*-Mücken wurden reife Gametozyten von WT und *PfCCp4*-KO der Klone K4H, L4C, M1H, O12B sowie P3D wie oben beschrieben kultiviert. Jeweils 5 ml dieser Kulturen wurden fünf Minuten bei 1300g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 400 µl vorgewärmten Erythrozyten der Blutgruppe A+ resuspendiert. Die Erythrozyten waren vorher mit humanem Serum der Blutgruppe A+ auf einen Hämatokritwert von 50 % eingestellt worden. Der Ansatz wurde jeweils in eine auf 37 °C vorgewärmte Fütterungsvorrichtung (Abb. 2.6) überführt und etwa 100 Mücken 20 Minuten lang zur Aufnahme einer Blutmahlzeit überlassen. Die verwendeten *Anopheles-stephensi*-Mücken wurden vom NYU Medical Center zur Verfügung gestellt und waren zum Zeitpunkt der Fütterung nicht älter als drei bis fünf Tage. Nach Entfernung von Mücken, die keine Blutmahlzeit aufgenommen hatten, wurden die verbleibenden *Anopheles* täglich mit Zuckerlösung gefüttert und bei 26 °C in einer Luftfeuchtigkeit von 60 % bis 80 % inkubiert.



Abb. 2.6. Membranfütterung von *Anopheles stephensi*.¹⁸

Zehn bis zwölf Tage nach der Fütterung wurde die Hälfte der Mücken auf Eis betäubt und in 1 x PBS überführt. Anschließend wurde bei zehnfacher Vergrößerung unter einem Binokular der Mitteldarm isoliert. Dazu wurde eine Mücke am Thorax mit einer Uhrmacherpinzette fixiert, während mit einer zweiten Uhrmacherpinzette am fünften Glied des Abdomen solange vorsichtig gezogen wurde, bis sich das Abdomen vom Thorax löste (Abb. 2.7).

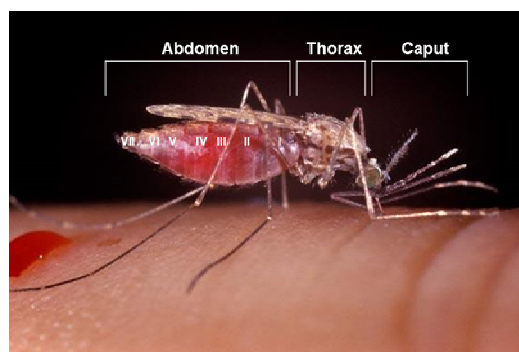


Abb. 2.7. Nomenklatur der Körperabschnitte von *Anopheles*.¹⁹

Jeweils fünf der freigelegten Mitteldärme wurden auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Tropfen einer 0,1%igen Mercurochrome™-Lösung in PBS überschichtet, mit einem Deckgläschen bedeckt und bei 400-facher Vergrößerung auf Oozystenbildung untersucht (Abb. 2.8A). Nach 18 bis 22 Tagen wurden aus den restlichen Mücken die dreigelappten Speicheldrüsen präpariert (Abb. 2.8B), indem mit einer Uhrmacherpinzette der Kopf fixiert wurde, während mit einer zweiten Pinzette am posterioren Ende des Thorax gezogen wurde, bis er sich vom Kopf löste und die Speicheldrüsen freigab. Diese wurden in PBS auf einen Objektträger überführt und bei 400-facher Vergrößerung auf die Präsenz von Sporoziten untersucht.

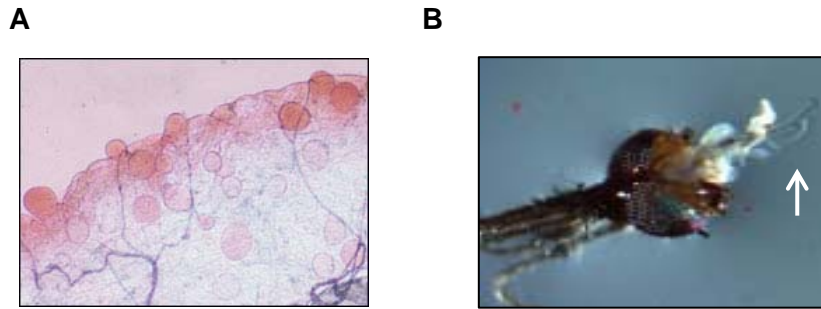


Abb. 2.8. *Anopheles-stephensi*-Präparate. A. Mercurochrome™-gefärbter *Anopheles*-Mitteldarm mit *P.-falciparum*-Oozysten. B. *Anopheles*-Kopf mit dreigelappten Speicheldrüsen.²⁰

Die Isolation und Fixierung von Ookinetenproben für Immunfluoreszenzstudien erfolgte am Imperial College, London. Dafür wurden Mitteldärme 24 Stunden nach Fütterung präpariert, einzeln auf einem Objektträger der Länge nach ausgestrichen und zehn Minuten in Methanol fixiert.

Auftauen von *P.-falciparum*-Kulturen

Grundlegendes Prinzip beim Auftauen von gefrorenen *P.-falciparum*-Kulturen stellt das behutsame Angleichen des Salzgehalts vom Hochsalzniveau der Einfrierlösung Glycerolyte 57 an das Niedrigsalzniveau physiologischer Bedingungen dar. Hierzu wurde eine eingefrorene Blutkultur auf Eis aufgetaut, in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und zunächst tropfenweise mit 200 µl einer 12%igen NaCl-Lösung versetzt. Nach zwei Minuten Inkubation bei RT wurden 10 ml 1,6%ige NaCl-Lösung tropfenweise zugegeben und die Suspension fünf Minuten bei 1300g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend vorsichtig in 10 ml 0,2 % Dextrose/0,9 % NaCl resuspendiert und erneut fünf Minuten bei 1300g zentrifugiert. Die Zellen wurden schließlich in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen, mit 500 µl Erythrozyten der Blutgruppe A+ vermischt und zur weiteren Kultivierung (s. o.) in eine 25-cm²-Zellkulturflasche überführt.

Konservieren von *P.-falciparum*-Kulturen

Für eine erfolgreiche Kryokonservierung von *P. falciparum* ist es essentiell, ausschließlich Kulturen zu verwenden, in denen sich die Parasiten zum größten Teil im Ringstadium befinden. Zum Konservieren wurde eine 5-ml-Kultur in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und fünf Minuten bei 1300g abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend im fünffachen Volumen Glycerolyte 57 resuspendiert, fünf Minuten bei RT inkubiert und in einer Styropor-Box bei -80 °C langsam eingefroren. Derart konservierte Kulturen lassen sich bei -80 °C monate- bis jahrelang lagern.

2.2.1.6 Bestimmung der Parasitämie mittels Giemsa-Färbung

Die regelmäßige Kontrolle des Parasitenwachstums ist für eine erfolgreiche Zellkultur unerlässlich. Daher wurde zur Bestimmung der Parasitämie alle drei bis vier Tage ein dünner Blutausstrich der kontinuierlichen Kulturen angefertigt (Abb. 2.9B).

Hierfür wurden zunächst 500 µl einer Parasitenkultur eine Minute lang bei 3400g abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis zum zweifachen Pelletvolumen abgenommen, und die Zellen im restlichen Medium resuspendiert, bevor 15 µl des Gemisches auf einen Objektträger übertragen wurden. Mit Hilfe eines zweiten Objektträgers wurde der Tropfen dünn ausgestrichen (Abb. 2.9A), unter Luftstrom zügig getrocknet, zur Fixierung mit Methanol abgespült, erneut getrocknet und danach zehn Minuten in Giemsa-Lösung inkubiert. Diese war zuvor mit H_2O_{bidest} in einem Verhältnis von 1:25 verdünnt worden. Überschüssige Giemsa-Lösung wurde mit H_2O_{bidest} entfernt und der Ausstrich ein letztes Mal getrocknet. Bei 1000-facher Vergrößerung wurde mit einem Ölimmersionsobjektiv schließlich die Zelldichte am Lichtmikroskop bestimmt. Zur Überwachung der Gametozytenreifung wurde etwa zehn Tage nach Anlegen der Kultur alle zwei Tage ein Ausstrich angefertigt. Die fünf Reifestadien von Gametozyten wurden bereits unter 1.2.2 beschrieben. Aufnahmen wurden an einem AxioPhot Mikroskop anhand einer AxioCam Kamera angefertigt.

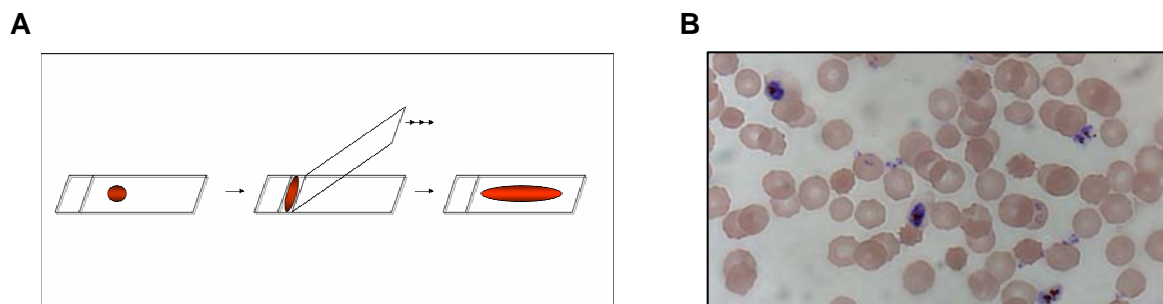


Abb. 2.9. Blutausstrich. A. Technik des dünnen Blutausstrichs. B. Dünner Blutausstrich asexueller *P.-falciparum*-Stadien nach Giemsa-Färbung.²¹

2.2.1.7 Exflagellationstest

Zur Bestimmung des Reifegrades von Gametozyten wurden neben den Blutausstrichen ebenfalls Exflagellationstests durchgeführt. Hierfür wurden 500 µl einer Gametozytenkultur des Stadium V eine Minute lang bei 3400g abzentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen, das Zellpellet entweder in humanem A+-Serum oder in 0,1 mM Xanthurensäure in PBS resuspendiert und 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20 µl des

Gemisches auf einen Objektträger getropft, mit einem Deckgläschen abgedeckt und bei 400-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop begutachtet. Eine ausreichende Reife der Gametozyten war erreicht, wenn mindestens drei Exflagellationskomplexe pro Sichtfeld beobachtet werden konnten. Reife Gametozyten, sowie aus ihnen differenzierte Gameten und Zygoten, wurden entweder für Western-Blot-Analysen (siehe Kapitel 2.2.3.5) und Interaktionsexperimente (siehe Kapitel 2.2.3.6) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.8) oder inaktiviert bzw. aktiviert für Immunfluoreszenzstudien (siehe Kapitel 2.2.1.10) auf Objektträger aufgetragen.

2.2.1.8 Aufreinigung von Parasitenstadien

Die Aufreinigung von Gametozyten, Gameten und Zygoten erfolgte durch Dichtezentrifugation entlang eines Accudenz™-Gradienten. Zur Erstellung des Gradienten wurde Accudenz™ zunächst in der entsprechenden Konzentration (11 und 16 % für Gametozyten, 6 und 11 % für Gameten und Zygoten) in vorgewärmtem RPMI-*incomplete* gelöst. Danach wurde die Lösung mit dem geringeren Accudenz™-Gehalt zuerst in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit der höher prozentigen Lösung sehr langsam unterschichtet. Für die Aufreinigung reifer Gametozyten wurden pro Gradient Kulturen aus zwei 75-cm²-Flaschen fünf Minuten bei 1300g und 37 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10 ml vorgewärmtem RPMI-*incomplete* resuspendiert und langsam auf den Gradienten geschichtet (Abb. 2.10). Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 3400g und 37 °C wurden die Gametozyten an der Interphase der Gradienten gesammelt (Abb. 2.10), in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt, mit vorgewärmtem RPMI-*incomplete* aufgefüllt und nach sorgfältigem Invertieren fünf Minuten bei 1300g und 37 °C gewaschen. Das resultierende Zellpellet wurde nach mikroskopischer Kontrolle für Western-Blot-Analysen in 80-100 µl PBS und Probenpuffer mit 25 mM DTT aufgenommen, für Ko-Immunpräzipitationsstudien in 60 µl PBS-Mix. Folgte der Aufreinigung die Isolation von mRNA, wurde das Pellet in 1 ml TRIZOL gelöst.

Zur Gameten- bzw. Zygotengewinnung wurden zunächst reife Gametozyten von zwei 75-cm²-Kulturflaschen fünf Minuten bei 1300g und 37 °C abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet entweder in 3 ml A+-Serum oder in 0,1 mM Xanthurensäure in PBS resuspendiert und die Zellsuspension 30 Minuten bzw. über Nacht bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf einen Gradienten aus 6 % und 11 % Accudenz™ in RPMI-*incomplete* aufgetragen und analog zum oben beschriebenen Protokoll aufgereinigt.

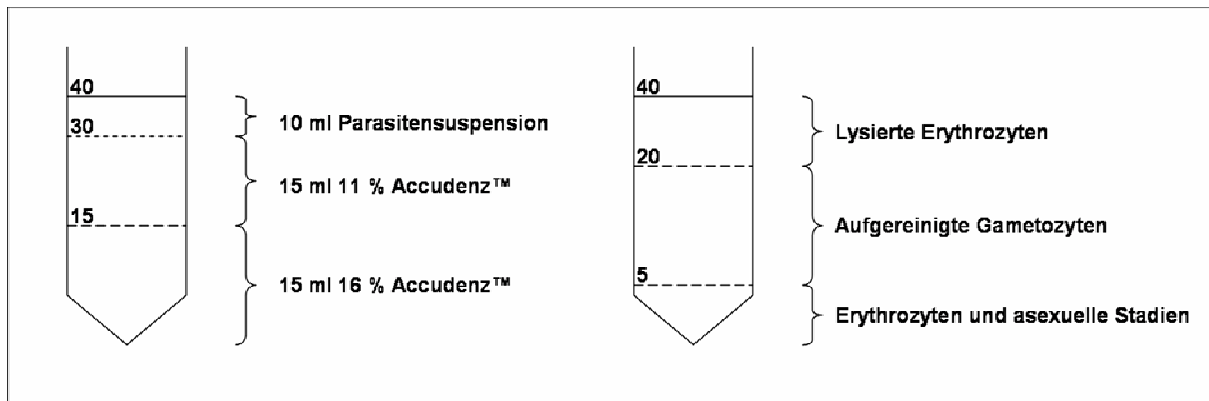


Abb. 2.10. Schema eines Accudenz™-Gradienten vor (links) und nach (rechts) Dichtezentrifugation am Beispiel der Gametozytenaufreinigung.²²

Die Aufreinigung asexueller Stadien erfolgte durch Zentrifugieren von 5 ml Parasitenkultur (3-5 % Parasitämie) für fünf Minuten bei 1300g. Danach wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, mit 20 µl einer 10%igen Saponinlösung versetzt, 30 Sekunden auf einem Vortexer gemischt und fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach zwei Minuten Zentrifugation bei 16.000g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS gewaschen. Für Western-Blot-Analysen erfolgte die Aufnahme der Zellen in 75 µl PBS und 75 µl Probenpuffer mit 25 mM DTT, für mRNA Isolation in 1 ml TRIZOL. Die Proteinproben wurden bei -20 °C gelagert; im Falle der RNA-Isolation wurden sie umgehend weiter verarbeitet.

2.2.1.9 Transfektion von *Plasmodium falciparum* und klonale Selektion von *PfCCp4-knockout*-Parasiten

Zur Funktionsanalyse von *PfCCp4* erfolgte die Herstellung von *PfCCp4*-KO-Mutanten durch Integration des KO-Konstrukts *pPfCCp4-KO* mittels homologer *single-crossover*-Rekombination. Ein Schema des *PfCCp4*-WT-Lokus, des KO-Konstrukts sowie des *PfCCp4*-KO-Lokus nach Vektorintegration ist in Abb. 2.11 dargestellt.

Diese Arbeiten, inklusive Klonierung des KO-Konstrukts (siehe Kapitel 2.2.2.2 bis 2.2.2.7), seine Transfektion in Erythrozyten und die klonale Selektion von *PfCCp4*-KO-Mutanten, wurden von Dr. Gabriele Pradel am WMC in New York durchgeführt. Die Transfektion des KO-Konstrukts und die anschließende klonale Selektion wurden in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Dafür wurden zunächst 300 µl Erythrozyten der Blutgruppe A+ in einem 15-ml-Reaktionsgefäß fünf Minuten bei 1300g abzentrifugiert, in 5 ml Cytomix-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 300 µl Cytomix-Puffer aufgenommen, der 50 µg des KO-Konstrukts *pPfCCp4-KO* enthielt, steril in eine

0,2-cm-Elektroporationsküvette überführt und auf Eis gelagert. Die Elektroporation der Zellen erfolgte zehn Sekunden bei einer Spannung von 0,31 kV und einer Leistung von 975 μ F. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2,5 ml Zellkulturmedium aus der Küvette gespült und fünf Minuten bei 1300g abzentrifugiert. Zwei identische Ansätze wurden vereinigt und in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert.

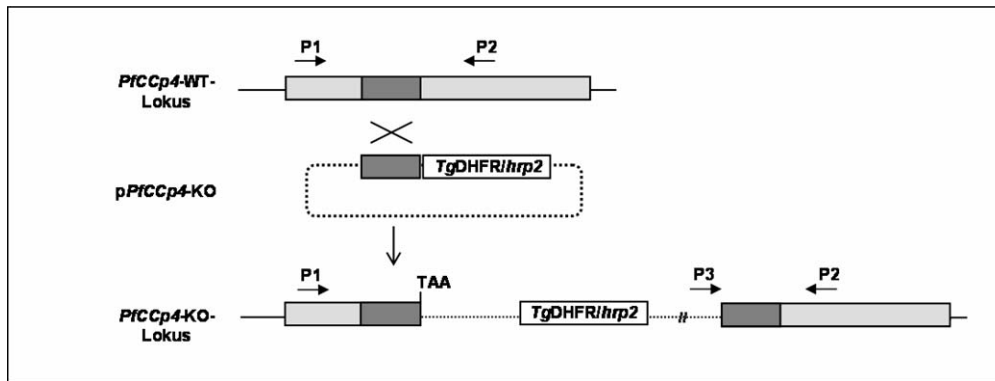


Abb. 2.11. Schema des *PfCCp4*-Genlokus vor und nach Genausschaltung. Durch Rekombination des WT-Lokus mit dem KO-Konstrukt *pPfCCp4-KO* an der homologen Region (dunkelgrau) wird der *PfCCp4*-Lokus (hellgrau) entzwei gespalten. Es entsteht eine pseudo-diploide Genanordnung mit Pyrimethamin-Resistenzkassette und eingeführtem Stopkodon (TAA). Die Oligonukleotide P1, P2 und P3 dienen der diagnostischen PCR.²³

Die elektroporierten Zellen wurden mit 500 μ l einer asexuellen, kontinuierlichen WT-Parasitenkultur vermischt und in eine 25-cm²-Zellkulturflasche überführt. Zum Zeitpunkt der ersten Passage wurde der Prozess wiederholt und die Parasiten in frisch elektroporierten Zellen verdünnt. Drei Tage später wurde zur positiven Selektion der *TgDHFR*-Expression auf Zellkulturmedium mit 0,16 μ M Pyrimethamin umgestellt. Nach 90 Tagen wurde anhand des *QIAmp Blood Mini Kits* genomische DNA isoliert und mittels diagnostischer PCR (siehe Kapitel 2.2.2.2) unter Verwendung der Oligonukleotide M13R (Abb. 2.11, P3) und *PfCCp4RT1 antisense* (P2; Produktgröße im KO 1063 bp) auf Integration untersucht. Parallel dazu wurde die Präsenz des *PfCCp4*-WT-Lokus anhand der Oligonukleotide *PfCCp4rp1 sense* (P1) und *PfCCp4RT1 antisense* (P2; Produktgröße im WT 1145 bp) überprüft. Nicht integriertes Episom wurde mit den Oligonukleotiden M13R und *PfCCp4KO-1 antisense* (Produktgröße 552 bp) nachgewiesen.

Danach erfolgte die klonale Selektion von *PfCCp4*-KO-Mutanten durch einzelnes Aussähen der Parasiten und Malstat-Screening in Mikrotiterplatten (Goodyer und Taraschi, 1997). Dazu wurden die zwei polyklonalen Kulturen in jeweils drei Mikrotiterplatten soweit verdünnt, dass sich pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte weniger als ein Parasit in 200 μ l Zellkulturmedium befand. Die Kultivierung erfolgte drei Wochen lang, indem alle drei Tage

das verbrauchte Medium durch 150 µl frisches, Pyrimethamin-haltiges Medium ersetzt wurde. Zum Begasen wurden die Platten in eine abgeschlossene Kammer transferiert und das Zellkulturgas zwei Minuten durch ein Ventil eingeleitet. Die Inkubation der Platten erfolgte innerhalb der Kammer in einem Wärmeschrank bei 37 °C. Nach drei Wochen wurden pro Vertiefung jeweils 20 µl Zellsuspension in eine neue Mikrotiterplatte überführt und mit 100 µl Malstat-Reagenz sowie 20 µl NBT/Diaphorase (1:1; jeweils 1 mg/ml) versetzt. Der Ansatz wurde 30 bis 50 Minuten bei RT geschüttelt, bis sich die parasitenhaltigen Vertiefungen rot färbten. Die photometrische Auswertung erfolgte durch Messung bei 640 nm. Zehn Klone wurden daraufhin weiter kultiviert und nach Isolation genomischer DNA durch diagnostische PCR analysiert (s. o.). Die Kultivierung der detektierten *PfCCp4*-Klone K4H, M1H, L4C, O12B und P3D erfolgte entsprechend der WT-Zellkulturmethoden, jedoch wurde stets Zellkulturmedium mit Pyrimethamin verwendet. Einzige Ausnahme stellte die Aufnahme des Zellpellets unmittelbar nach dem Auftauen in Normalmedium dar. Hiernach wurde bei der ersten Passage auf Pyrimethamin-haltiges Medium umgestellt.

2.2.1.10 Immunfluoreszenzstudien

Eine der wichtigsten lichtmikroskopischen Techniken zur Charakterisierung von zellulären Strukturen ist die Immunfluoreszenz. Man unterscheidet dabei die direkte und die indirekte Immunfluoreszenz. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien zur stadien- und geschlechtsspezifischen Expression von *PfCCp4* in WT und *PfCCp4*-KO-Parasiten wurden ausschließlich mittels indirekter Immunfluoreszenz (Abb. 2.12) angefertigt.

Hierfür wurden die Vertiefungen eines teflonbeschichteten Objektträgers dünn mit der gewünschten Probe versehen, an der Luft getrocknet und zehn Minuten in -80-°C-kaltem Methanol fixiert. Nach erneuter Trocknung wurden unspezifische Bindungsstellen 30 Minuten mit einer Blockierungslösung aus 0,5 % BSA und 0,01 % Saponin in PBS in einer Färbeschale abgesättigt. Es folgte ein weiterer Blockierungsschritt, bei dem auf jede Vertiefung jeweils ein Tropfen Blockierungslösung mit 1 % neutralem Ziegen Serum (NGS) gegeben wurde. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten lang inkubiert. Um ein Austrocknen der Proben zu verhindern, wurde der Objektträger währenddessen in einer feuchten Kammer gelagert. Es schloss sich die Inkubation des Primärantikörpers an. Dafür wurde der gewünschte Antikörper in Blockierungslösung verdünnt (siehe Kapitel 2.1.10) und in einem 25-µl-Tropfen auf die Probe gegeben. Nach eineinhalb Stunden Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C folgten zwei zehnmütige Waschschrte mit Blockierungslösung in einer Färbeschale. Die Probe wurde anschließend mit einem Sekundärantikörper versehen, der entweder an Alexa-488 (grüne Fluoreszenz) oder an Alexa-594 (rote Fluoreszenz) gekoppelt

war. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde am 25- μ l-Tropfen in einer feuchten Kammer bei 37 °C. Danach wurde das Präparat zweimal fünf Minuten in PBS gewaschen und eine Minute mit einer 0,01%igen *Evans-Blue*-Lösung gegengefärbt, falls vorher keine Markierung mit Alexa-594 durchgeführt wurde. Es folgte zweimal zehn Minuten Waschen in PBS. Zum Anfärben des Kernmaterials schloss sich eine Minute Inkubation in *Hoechst Nuclear Stain* an, das vorher in einem Verhältnis von 1:5000 in PBS verdünnt worden war. Danach wurde ein weiteres Mal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Schließlich wurde das Präparat mit Einbettungsmedium überschichtet und mit Deckgläschen und Nagellack luftdicht verschlossen.

Bei Doppelmarkierungen erfolgte die Inkubation der beiden Antikörpersets nacheinander, d.h. zunächst wurde der erste Primärantikörper gefolgt von seinem zugehörigen Sekundärantikörper appliziert, und erst danach der zweite Primärantikörper und sein Sekundärantikörper. Im Falle dieser Markierung wurde keine Gegenfärbung der Erythrozyten mit *Evans Blue* durchgeführt.

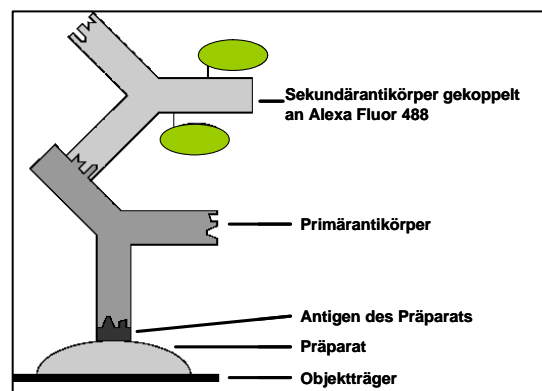


Abb. 2.12. Reaktionsschema einer indirekten Immunfluoreszenz. Ein Antigen wird von seinem spezifischen Primärantikörper gebunden, der wiederum von einem Zweitantikörper erkannt wird. Dieser ist an ein Fluorochrom gekoppelt, das bei Anregung Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert.²⁴

Alternativ zur Methanolfixierung wurden Immunfluoreszenzproben in einer Lösung von 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Dazu wurde 1 ml der gewünschten Parasitenkultur eine Minute lang bei 3400g abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in frischer 4%iger PFA-Lösung resuspendiert. Die Fixierung erfolgte unter Rotation über Nacht bei 4 °C. Die Antikörperinkubation wurde anschließend analog zur Methanolfixierung, jedoch in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Zwischen den verschiedenen Inkubationsschritten wurde die Probe stets eine Minute bei 3400g abzentrifugiert. Für die Kernfärbung wurde die Probe 30 Minuten lang am Tropfen mit einer 1:400-Verdünnung von Toto-3 in PBS inkubiert. Anschließend wurde die Probe zweimal zehn Minuten in PBS gewaschen und nach

Zentrifugation in 100-150 µl einer etwa 50-°C-warmen, 1%igen Agar-Suspension in PBS resuspendiert. Vor dem Auskühlen wurde das Agar-Zellen-Gemisch rasch hauchdünn auf die Vertiefungen eines teflonbeschichteten Objektträgers aufgebracht und anschließend bei 37 °C getrocknet. Gegebenenfalls folgte eine Gegenfärbung mit *Evans Blue* bevor die Proben eingebettet und luftdicht verschlossen wurden (s. o.). Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C. Aufnahmen wurden entweder mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiolab HBO 50/AC anhand einer MP 5000 Kamera oder am konfokalen Mikroskop Zeiss LSM 510 angefertigt. Bildbearbeitungen wurden unter Verwendung der Adobe® Photoshop CS Software durchgeführt.

2.2.1.11 Elektronenmikroskopische Studien

Zur Analyse der ultrastrukturellen Lokalisation von *PfCCp4* mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden Gametozyten vor dem Einbetten in Epon unter Verwendung eines Sekundärantikörpers immunmarkiert. Dieser war entweder an alkalische Phosphatase (ALP) oder an 12-nm-Goldpartikel gekoppelt.

Immunmarkierung von *PfCCp4* in Gametozyten

Für die ALP-Markierung wurde 1 ml einer reifen WT-Gametozytenkultur eine Minute bei 3400g abzentrifugiert, in 1 ml einer 4%igen PFA-Lösung resuspendiert und über Nacht bei 4 °C unter Rotation fixiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet wippend 30 Minuten bei 37 °C in PBS gewaschen, bevor unspezifische Bindungsstellen abgesättigt wurden. Dazu wurde die Probe zunächst 30 Minuten bei 37 °C in einer Blockierungslösung aus 0,5 % BSA und 0,05 % Saponin in PBS inkubiert, gefolgt von weiteren 30 Minuten Inkubation unter Zugabe von 1 % NGS. Danach schloss sich die Immunmarkierung mit polyklonalem *PfCCp4rp1*-Antiserum in einer Verdünnung von 1:50 für zwei Stunden bei 37 °C an. Nach zwei zehnminütigen Waschschritten in Blockierungslösung wurde die Probe mit dem ALP-gekoppelten Sekundärantikörper vermisch, der zuvor 1:1000 in Blockierungslösung verdünnt worden war. Es folgten einmal zehn Minuten Waschen in PBS und einmal zehn Minuten Waschen in TBS bei 37 °C, bevor die Zellen 60 Minuten mit der ALP-Substratlösung NBT/BCIP gefärbt wurden. Danach wurde die Probe zum Abstoppen der Farbreaktion zweimal zehn Minuten in TBS-Puffer gewaschen, der 1 % einer 0,5 M Lösung EDTA enthielt. Die Fixierung erfolgte über Nacht in 1%igem Glutaraldehyd in PFA-Lösung. Die Goldmarkierung entsprach dem ALP-Protokoll, jedoch enthielt der Inkubationspuffer 0,05 % Saponin, und es wurde zur Verbesserung der Permeabilisierung beim zweiten Absättigungsschritt 0,2 % Triton-X-100 zur Blockierungslösung gegeben. Die Inkubation mit

dem unverdünnten Primärantikörper anti-*PfCCp4rp1* erfolgte sechs Stunden bei 37 °C. Der Sekundärantikörper, der an 12-nm-Goldpartikel gekoppelt war, wurde in einer 1:10-Verdünnung zwölf Stunden bei 4 °C auf die Probe gegeben. Anschließend wurde TBS zum Waschen verwendet. Die Färbung in NBT/BCIP entfiel.

Vor der Entwässerung wurden die Proben zweimal 30 Minuten in PBS gewaschen, eine Stunde mit einer Lösung von 1%igem Osmiumtetroxid und 1,5%igem Kaliumhexacyanoferrat in PBS nachfixiert und zweimal eine Minuten in H_2O_{bidest} gespült. Danach folgten jeweils zweimal 15 Minuten Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (p. a.) aus 70%igem, 80%igem, 95%igem sowie 100%igem Ethanol und zweimal 30 Minuten in 1,2-Epoxypropan bei RT. Das reine Epoxypropan wurde durch ein 1:1-Gemisch aus Epon und Epoxypropan ersetzt und eine Stunde bei RT inkubiert. Hierauf wurden die Proben nach erneuter Zentrifugation mit Epon überschichtet, über Nacht bei RT und schließlich zwei Tage bei 60 °C im Eppendorf-Reaktionsgefäß auspolymerisiert. Abschließend wurde das polymerisierte Pellet abgesägt, in eine Polymerisierungskammer überführt und erneut in frischem Epon zwei Tage bei 60 °C eingebettet.

Trimmen und Schneiden der Präparate

Die auspolymerisierten Proben wurden vor dem Schneiden am Ultramikrotom aus der Polymerisierungskammer gelöst, in einem Probenhalter fixiert und mit einer Rasierklinge am Binokular zunächst zugetrimmt (Abb. 2.13). Dafür wurde horizontal soviel Epon abgetragen, dass sich die Schnittfläche im Gewebe befand, bevor soviel Material an den Seiten entfernt wurde, dass eine ca. 1-mm²-große pyramidenartige Schnittfläche entstand. Diese wurde anschließend am Ultramikrotom unter Verwendung eines Glasmessers geglättet. Mit einem Diamantmesser angefertigte Semidünnschnitte (0,2 µm; grün-violette Lichtbrechung) wurden auf einen Objektträger transferiert und durch Verdampfen des überschüssigen H_2O_{bidest} fixiert. Nach Färbung mit einem 1:1-Gemisch einer Methylenblau-AzurII-Lösung wurde das Präparat lichtmikroskopisch auf seine Beschaffenheit untersucht und bei Eignung für Ultradünnschnitte verwendet. Diese etwa 50-nm-dünnen Schnitte (silber-goldene Lichtbrechung) wurden durch Bedampfung mit Chloroform geglättet und auf Kupfernetzchen übertragen, die aus 100 Maschen bestanden und mit Parlodionfolie beschichtet waren. Anschließend wurden sie luftgetrocknet und in einer Gitterbox bei RT gelagert.

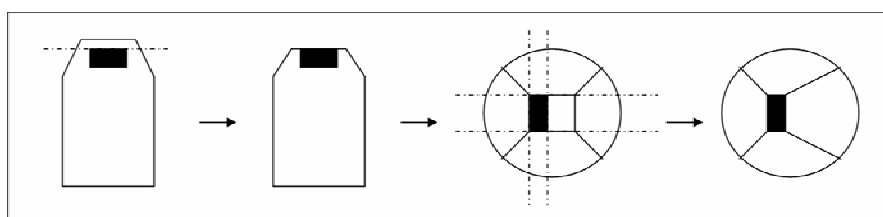


Abb. 2.13. Schema des Präparatzuschneids nach Eponeinbettung.²⁵

Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte

Dünnschnitte mit biologischen Präparaten haben im Transmissionselektronenmikroskop ein geringes Vermögen, Elektronen zu streuen. Um ihre Strukturen sichtbar zu machen, muss ihr Kontrast durch Anlagerung von Schwermetallatomen auf der Schnittoberfläche erhöht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben dreimal eine Minute kopfüber in jeweils einem Tropfen sterilfiltriertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf Parafilm gewaschen und anschließend 30 Minuten in einem Tropfen einer 1%igen Uranylacetat-Lösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ nachkontrastiert. Überschüssiges Uranylacetat wurde durch dreimaliges Waschen in jeweils einem Tropfen sterilfiltriertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ entfernt. Die Schnitte wurden an einem Zeiss TEM 10 fotografiert. Die Negative wurden eingescannt und mit Adobe® Photoshop CS Software bearbeitet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann spektrophotometrisch durch Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Hierzu wurden Verdünnungen der zu messenden DNA-Lösungen (gewöhnlich 1:20 bei Mini- und Maxi-Präparation; 1:100 bei RNA) in 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ hergestellt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen.

Eine Absorptionseinheit (A_{260}) entspricht:

- 40 $\mu\text{g/ml}$ bei RNA
- 50 $\mu\text{g/ml}$ bei dsDNA

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors lässt sich mit diesen Angaben die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmen. Durch das Verhältnis von A_{260}/A_{280} kann außerdem eine Verunreinigung der Probe durch Proteine festgestellt werden. Der optimale Wert für DNA liegt etwa bei 1,8, während er für RNA 2,0 beträgt.

2.2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt und ermöglichte es erstmals eine bestimmte DNA-Sequenz beliebig oft zu amplifizieren. Voraussetzung ist die Kenntnis der

Basenabfolge flankierender Regionen, anhand derer entsprechende Oligonukleotide entworfen werden können. Zusätzlich lassen sich über geschicktes Oligonukleotiddesign Mutationen wie Substitutionen, Deletionen oder das Einführen von Restriktionsschnittstellen bewerkstelligen. Zu den Grundbestandteilen einer PCR gehören: doppelsträngige DNA (*template*-DNA), ein Oligonukleotidpaar (komplementär zu den flankierenden Regionen), die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP (A), dGTP (G), dCTP (C) und dTTP (T), eine hitzestabile DNA-Polymerase sowie ein PCR-Gerät.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 95 °C
2. Anlagern der Oligonukleotide an die entstandenen Einzelstränge durch rasches Abkühlen auf 48 °C bis 60 °C (*Annealing*)
3. DNA-Synthese bei etwa 72 °C, je nach Temperaturoptimum der DNA-Polymerase

Die *Annealing*-Temperatur lässt sich aus der folgenden Formel berechnen:

$$T_A = T_M - 5 \text{ bis } 10 \text{ °C} \text{ wobei} \quad T_A: \text{Annealing-Temperatur}$$

$$T_M: \text{Schmelztemperatur}$$

Für die Schmelztemperatur gilt:

$$T_M = 2 \text{ °C} \times (\text{Anzahl A bzw. T}) + 4 \text{ °C} \times (\text{Anzahl G bzw. C})$$

Die Amplifikation von Nukleinsäuren mittels PCR stellt eine essentielle Grundlage für die Klonierung von rekombinanten Proteinen oder Konstrukten für homologe Rekombination dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die rekombinanten Proteine (rp) *PfCCp4rp1*, *PfCCp4rp2*, *PfCCp4rp3*, *PfCCp4rp4* sowie *PfCCp4rp5* (Abb. 2.14) angelehnt an die *PfCCp4*-Domänenstruktur für Interaktionsstudien bzw. zur Antikörperproduktion kloniert werden.

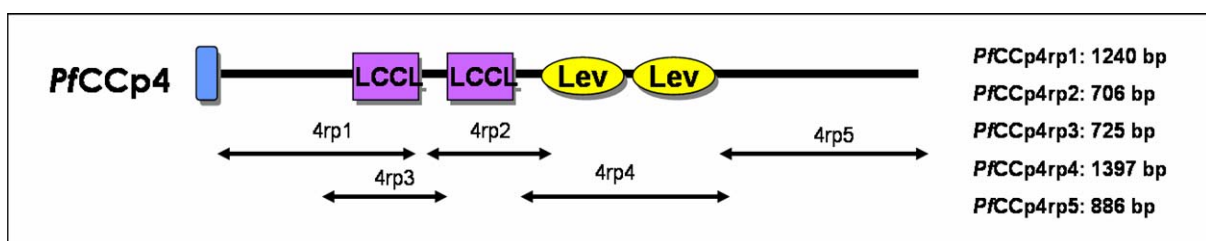


Abb. 2.14. Relative Position und Größe der amplifizierten Genabschnitte zur Klonierung domänen-spezifischer, rekombinanter *PfCCp4*-Proteine.²⁶

Für die gerichtete Klonierung der rekombinanten Proteine in die Vektoren pSUMO/pSMT3 (6His/SUMO-Fusionspeptid) bzw. pGEX-4T-1 (GST-Fusionspeptid, siehe Kapitel 2.1.7) wurde am 5'-Terminus der entsprechenden Oligonukleotide eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle eingefügt, am 3'-Terminus eine *Not*I-Schnittstelle sowie ein Stopkodon (TAA).

Das Konstrukt zur Herstellung von *PfCCp4*-KO-Mutanten, *pPfCCp4*-KO, wurde von Dr. Gabriele Pradel am WMC New York kloniert, soll der Vollständigkeit halber hier aber trotzdem Erwähnung finden. Die PCR-amplifizierte Region zur homologen Rekombination (Abb. 2.11) trägt am 5'-Terminus eine eingefügte *Sac*II-Schnittstelle, am 3'-Terminus eine *Not*I-Schnittstelle sowie einen Stopkodon (TAA).

PCR-Reaktionen für Klonierungen wurden stets unter Verwendung von *Pfx*-Polymerase durchgeführt, die über hohe Prozessivität und eine *proof-reading*-Funktion verfügt. Pro rekombinantem Protein wurden fünf PCR-Reaktionen angesetzt. Ein Ansatz enthielt:

10 x Polymerasepuffer	5 µl
MgSO ₄ (50 mM)	1 µl
<i>template-DNA</i>	100 ng
dNTPs (10 mM)	1,5 µl
Polymerase	0,5 µl
Oligonukleotid <i>sense</i> (100 pmol/µl)	1 µl
Oligonukleotid <i>antisense</i> (100 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Die PCR-Zyklen lauteten:

95 °C	Denaturieren	4 Min.	} 33 Zyklen
95 °C	Denaturieren	30 Sek.	
50 °C	Hybridisierung	30 Sek.	
62 °C	Elongation	1 Min./700 bp	
72 °C	Abschließende Elongation	3 Min.	
10 °C	Lagerung	∞	

Semi-quantitative PCR

Eine Variante der herkömmlichen PCR stellt die so genannte RT-PCR dar, bei der cDNA als *template-DNA* fungiert, die vorher aus RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) hergestellt wurde (siehe Kapitel 2.2.2.10). Diese Form der PCR dient dazu, die Expression

eines Gens anhand seiner mRNA zu analysieren. Bei der Oligonukleotidwahl ist es wichtig, dass die Produktgröße etwa 200 bp beträgt, und dass sich das Produkt über eine Exon-Intron-Exon-Grenze des Gens erstreckt.

Bei der semi-quantitativen Untersuchung der Expression des *PfCCp4*-Transkripts wurden 2 µl cDNA der verschiedenen Parasitenstadien (asexuelle Stadien, Gametozyten, Gameten und Zygoten) in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Zyklenzahl variierte dabei zwischen 20, 25 und 30 Zyklen. Als Kontrollen dienten Oligonukleotidpaare gegen *PfAMA-1*, das in asexuellen Stadien exprimiert wird (Peterson *et al.*, 1989; Narum und Thomas, 1994; Hodder *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1996), gegen *PfCCp1* (Expression in Gametozyten und Makrogameten; Pradel *et al.*, 2004, 2006; Pradel, 2007; Scholz *et al.*, 2007), gegen *Pfs25* (Expression in Makrogameten, Zygoten und Ookineten mit geringem Expressionsniveau in Gametozyten; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990) sowie gegen *Pfs28*, das in Zygoten und Ookineten exprimiert wird (Duffy und Kaslow, 1997). Die Positivkontrollen (+) enthielten genomische DNA, in Negativkontrollen (-) wurde keine DNA eingesetzt.

Diagnostische PCR

Für rein diagnostische PCR-Ansätze zur Analyse der *pPfCCp4*-KO-Integration wurde statt der hochwertigeren *Pfx*-Polymerase herkömmliche *Taq*-Polymerase verwendet. Dabei wurden 1,5 µl MgCl₂ (50 mM) statt 1 µl MgSO₄ in die Reaktion eingesetzt, und statt 1,5 µl nur 1 µl dNTPs (10 mM). Als diagnostische Oligonukleotide dienten M13R (Abb. 2.11; P3) und *PfCCp4RT1 antisense* (P2; Produktgröße im KO 1063 bp) sowie *PfCCp4rp1 sense* (P1) und *PfCCp4RT1 antisense* (P2; Produktgröße im WT 1145 bp).

2.2.2.3 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Die erhaltenen PCR-Fragmente für Klonierungen wurden mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution von fünf identischen PCR-Reaktionen erfolgte über nur eine Säule in 50 µl H₂O_{bidest.} Das zugrunde liegende Prinzip basiert auf der Fähigkeit von DNA in Anwesenheit von Hochsalzpuffern an Silikatmembranen zu binden, während Verunreinigungen wie Oligonukleotide, genomische DNA und Enzyme die Säule passieren und verworfen werden können.

2.2.2.4 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die spezifisch meist palindromische DNA-Bereiche erkennen und doppelsträngige DNA (dsDNA) an diesen Stellen spalten. Sie kommen natürlicherweise in Prokaryoten vor, um sich gegen die Invasion fremder DNA schützen zu können.

In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme von NEB für die gerichtete Klonierung von PCR-Produkten in die Expressionsvektoren verwendet. Die Schnittstellen lauteten *Bam*HI sowie *Not*I für pSUMO/pSMT3 und pGex-4T-1, und *Sac*II sowie *Not*I für den KO-Vektor pDT-Tg23:



Ein standardisierter Ansatz zum DNA-Verdau für die Klonierung rekombinanter Proteine in die Vektoren pSUMO/pSMT3 bzw. pGex-4T-1 enthielt:

Vektor-DNA	1-2 µg	bzw.	aufgereinigte PCR	43 µl
<i>Bam</i> HI-Puffer (10 x)	5 µl		<i>Bam</i> HI-Puffer (10 x)	5 µl
100 x BSA	0,5 µl		100 x BSA	0,5 µl
<i>Bam</i> HI	0,5 µl		<i>Bam</i> HI	0,5 µl
<i>Not</i> I	0,5 µl		<i>Not</i> I	0,5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl		H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Bei der Klonierung des KO-Konstrukts *pPfCCp4-KO* mittels pDT-Tg23-Vektor wurde folgender Verdau angesetzt und drei Stunden bei 37 °C inkubiert:

DNA	1-2 µg	bzw.	aufgereinigte PCR	43 µl
10 x Puffer NEB 4	5 µl		10 x Puffer NEB 4	5 µl
100 x BSA	0,5 µl		100 x BSA	0,5 µl
<i>Sac</i> II	0,5 µl		<i>Sac</i> II	0,5 µl
<i>Not</i> I	0,5 µl		<i>Not</i> I	0,5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl		H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Zur Verhinderung der Religation wurden freie Phosphatgruppen an den DNA-Enden mit Hilfe des Enzyms CIP abgespalten. Da das Enzym in jedem Puffer für Restriktionsenzyme arbeitet, wurde 1 µl davon direkt zum Verdau gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Durch Zugabe von 1/6 Volumen sechsfach DNA-Probenpuffer wurde die Reaktion beendet. Die Spaltprodukte des DNA-Verdau wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt.

2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei Nukleinsäuren handelt es sich um Polymere aus (Desoxy-)Ribose, verestert mit jeweils einer Purinbase (A, G) oder Pyrimidinbase (C, T bzw. U) und einem Phosphatrest. Diese Phosphatreste bedingen die negative Ladung der Nukleinsäuren, wodurch sich diese in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe gerichtet bewegen können. Die Geschwindigkeit eines Nukleinsäurefragments ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Zum Auftrennen eines Nukleinsäuregemisches eignet sich besonders eine inerte Matrix aus Agarose. Ihre Konzentration wird je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 0,3 % (Fragmente von 1 bis 30 kb) und 2,0 % (Fragmente von 0,1 bis 2 kb) variiert. Nach einem Gellauf kann DNA durch Inkubation in einem Ethidiumbromidbad angefärbt werden. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen DNA-Interkalator, der unter UV-Licht fluoresziert und somit DNA sichtbar macht.

In dieser Arbeit wurde für die Agarose-Gelelektrophorese meist 1%ige Agarose verwendet; Ausnahmen stellten nur 0,8%ige Gele für Analysen per Southern Blot dar. Die entsprechende Menge Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf etwa 50 °C luftblasenfrei in einen abgedichteten Gelschlitten gegossen; Taschen wurden durch Einsetzen eines Kammes geformt. Nach Polymerisierung wurde das Gel in der Laufkammer vollständig mit 1 x TAE-Puffer überschichtet, der Kamm gezogen und die Proben appliziert. Zuvor wurden die Proben zur Denaturierung von Sekundärstrukturen und Erhöhung der Dichte mit 6 x Probenpuffer vermischt. Die angelegte Spannung für eine MIDI-1-Kammer betrug 100 V, für eine MAXI-Kammer 200 V. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (1:10.000 in H₂O_{bidest}) inkubiert und anschließend unter UV-Licht analysiert. Die Bilder wurden eingescannt und mit Adobe[®] Photoshop CS Software bearbeitet.

2.2.2.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Bei präparativer Agarose-Gelelektrophorese zur Aufreinigung der restriktionsverdauten Klonierungskomponenten (Vektor und PCR) wurden die DNA-Fragmente nach dem Lauf unter UV-Licht lokalisiert und ausgeschnitten. Zur Elution und Reinigung der DNA wurde das

QIAquick Gel Extraction Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte in 50 µl H₂O_{bidest}. Dieser Aufreinigung liegt ebenfalls das bereits bei der PCR-Aufreinigung erläuterte Prinzip der Adhäsion von DNA an Silikatmembranen zu Grunde.

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl-Gruppen und 5'-Phosphat-Gruppen in dsDNA katalysiert. Zur Klonierung rekombinanter Proteine bzw. des KO-Konstrukts wurden der geschnittene Vektor und das PCR-Fragment im molaren 1:5-Verhältnis ligiert. Zur Berechnung diente folgende Formel:

$$\text{Masse PCR-Fragment [ng]} = \frac{(\text{Vektor [ng]} \times \text{Fragmentgröße [bp]} \times 5)}{\text{Vektorgröße [bp]}}$$

Bei der Ligation wurde folgender Ansatz gewählt:

PCR-Fragment	x µl
Vektor	y µl
H ₂ O _{bidest}	z µl
10 x Ligasepuffer	2 µl
T4 Ligase	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 10 µl

Die Inkubation erfolgte vier Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C. Nach Verdünnung des Ligationsansatzes mit 130 µl H₂O_{bidest} wurden 2 µl für eine Transformation (siehe Kapitel 2.2.1.4) verwendet.

2.2.2.8 Amplifizierung und Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien

Gemäß Kapitel 2.2.1.4 transformierte *E.-coli-OneShot*[®]-Top10-Bakterien wurden in LB-Medium unter den entsprechenden Selektionsbedingungen bei 37 °C schüttelnd kultiviert, bis sie die späte logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten. Danach wurden die Bakterien einer alkalischen Lyse unterzogen und die Plasmid-DNA isoliert. Je nach Verwendungszweck wurden zwei unterschiedliche Präparationsarten durchgeführt: Zum Analysieren von Bakterienklonen nach einer Transformation von Ligationsansätzen genügte eine verkürzte

Form der Plasmidpräparation (*Dirty Mini*). Wurde die DNA in höherer Reinheit z.B. für Sequenzierungen oder Transfektion benötigt, so wurde eine Plasmidpräparation mit Hilfe der entsprechenden Qiagen Mini- oder Maxi-Präparations-Kits gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Prinzipiell handelt es sich bei beiden Verfahren um eine alkalische Lyse verbunden mit einer Isopropanolfällung der DNA; bei den Kits kommen zur Erhöhung des DNA-Reinheitsgrades zusätzlich Silikatmembranen zum Einsatz. Ob eine Mini- oder Maxi-Präparation durchgeführt wurde, hing von der gewünschten Menge des Plasmids ab. Bei der Mini-Präparation können aus 3 ml Übernachtskultur (ÜNK) bis zu 20 µg *high-copy*-Plasmid-DNA gewonnen werden, bei einer Maxi-Präparation aus 1000 ml ÜNK bis zu 500 µg Plasmid-DNA. Die Lagerung der isolierten Plasmide erfolgte in H₂O_{bidest} bei -20 °C.

Für die Variante der *Dirty Mini* wurden 3 ml Bakterienkultur angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37 °C kultiviert. Die Bakterien wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, durch eine Minute Zentrifugation bei 16.000g sedimentiert und in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wurde der Ansatz durch sechsmaliges Invertieren gemischt und fünf bis zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurden 150 µl Lösung 3 zur Neutralisierung hinzugegeben. Die Probe wurde erneut invertierend gemischt und ein weiteres Mal fünf bis zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden zum Entfernen der RNA 450 µl einer fünfmolaren LiCl-Lösung hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde fünf bis zehn Minuten auf Eis inkubiert und fünfzehn Minuten bei 16.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA wurde unter Verwendung von Isopropanol gefällt. Dazu wurde der Überstand mit 0.6 Volumenanteilen Isopropanol invertierend gemischt, zehn Minuten bei RT inkubiert, zehn Minuten bei 16.000g zentrifugiert und zweimal mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das Waschen erfolgte durch zehnminütige Zentrifugation bei 16.000g. Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und schließlich in 30 µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

Für einen Kontrollverdau wurden 3 µl der *Dirty Mini*, mit 1 µl zehnfach-konzentriertem Puffer und 0,5 µl des gewünschten Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 10 µl mit H₂O_{bidest} versetzt, gemäß Herstellerempfehlung eine Stunde inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht konnten die Banden durch Ethidiumbromid visualisiert und beurteilt werden.

2.2.2.9 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierungen wurden am Gerät ABI Prism® 3100 in der Arbeitsgruppe von Dr. Weissbrich am Institut für Virologie der Universität Würzburg durchgeführt. Ein

Reaktionsansatz unter Verwendung der Komponenten des *BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* beinhaltete:

5 x Premix	2 µl
5 x Puffer	2 µl
<i>template</i> -DNA	500 ng
Oligonukleotid (100 pmol/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 10 µl

Zur Amplifikation wurde folgende PCR durchgeführt:

Denaturieren	95 °C	4 Min.	} 30 Zyklen
Denaturieren	95 °C	30 Sek.	
Hybridisieren	50 °C	30 Sek.	
Elongation	62 °C	4 Min.	
Abschließende Elongation	72 °C	3 Min.	

Vor Abgabe an Arbeitsgruppe Weissbrich wurde das PCR-Produkt durch Ethanol-Fällung gereinigt:

PCR	10 µl
H ₂ O _{bidest}	90 µl
3 M NaAc pH 4,6	10 µl
100 % EtOH	250 µl

Dieser Ansatz wurde 15 Minuten bei 16.000g zentrifugiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei RT wurde das Pellet etwa zehn Minuten bei RT getrocknet, bevor es in 25 µl Formamid resuspendiert wurde. Die Analyse der Sequenzen erfolgte über NCBI BLAST und BioEdit.

2.2.2.10 Isolation von RNA und Herstellung von cDNA

Das Grundprinzip dieser RNA-Aufreinigung beinhaltet die Zellyse, Inaktivierung von RNAsen und RNA-Isolation durch Phenol/Chloroform. Auf diese Weise wird die Gesamt-RNA der Zellen gewonnen. Zwar beträgt der Anteil von mRNA nur 2 %, dies reicht jedoch als Ausgangsprodukt für eine Analyse mittels RT-PCR völlig aus.

Isolation von RNA

Zur Transkriptionsanalyse von *PfCCp4* wurden asexuelle Parasiten, Gametozyten, Gameten und Zygoten wie in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben aufgereinigt und jeweils in 1 ml TRIZOL resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 0,2 ml Chloroform hinzugefügt und das Gemisch 15 Sekunden gevortext. Es folgten drei Minuten Inkubation bei RT und 15 Minuten Zentrifugation bei 16.000g und 4 °C. Die entstandene obere, wässrige RNA-Phase wurde abgenommen und zur RNA-Fällung in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Nach zehn Minuten Inkubation bei RT wurde die Probe zehn Minuten bei 16.000g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol durch fünfminütige Zentrifugation bei 3400g und 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen, die RNA luftgetrocknet und schließlich bei 55 °C in 30 µl H₂O_{bidest} gelöst. Die Konzentrationsbestimmung wurde gemäß Kapitel 2.2.2.1 durchgeführt, die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

DNase-Verdau der RNA-Proben

Um Verunreinigungen der RNA mit möglicherweise verschleppter genomischer DNA auszuschließen, wurde im Doppelansatz pro Probe folgender Ansatz gewählt:

RNA	2 µg
10 x DNase-Puffer	1 µl
DNase I	1 µl
H ₂ O _{bidest} (RNase frei)	ad 10 µl

Die Inkubation erfolgte 15 Minuten bei RT. Zum Inaktivieren der DNase I wurde der Ansatz mit 1 µl einer 25 mM EDTA-Lösung vermischt und 15 Minuten bei 65 °C inkubiert.

cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription wurde unter Verwendung des *SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR* folgender Ansatz verwendet:

RNA	2 µg
<i>random hexamers</i> (50 ng/µl)	1 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
H ₂ O _{bidest} (RNase frei)	ad 10 µl

Das Gemisch wurde fünf Minuten bei 65 °C und eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien hinzugegeben:

10 x RT-Puffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase OUT	1 µl

Nach zwei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeweils eine Probe des Doppelansatzes (+ RT) mit 1 µl *SuperScript™-II-Reverse-Transkriptase* versetzt, während die andere Probe als Negativkontrolle (-RT) diente. Die Ansätze wurden nacheinander zehn Minuten bei RT, 50 Minuten im 42 °C Wasserbad und zum Terminieren der Reaktion 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden sie kurz auf Eis abgekühlt, zum RNA-Abbau mit 1 µl RNAase H versetzt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C. Zur Durchführung einer semi-quantitativen PCR siehe Kapitel 2.2.2.2.

2.2.2.11 Isolation genomischer DNA aus *Plasmodium falciparum*

Genomische DNA aus *P.-falciparum*-Stadien diente zum einen der Verifizierung der *PfCCp4*-KO-Parasiten via Southern Blot und als *template*-DNA für die Klonierung rekombinanter Proteine. Zum anderen wurde sie als *template*-DNA für diagnostische PCRs bei ersten Analysen von *PfCCp4*-KO-Parasiten eingesetzt. Je nach Verwendungszweck variierte der Isolationsprozess. Genomische DNA, die als *template* für diagnostische PCRs dienen sollte, wurde mit Hilfe des *QIAamp Blood Mini Kit* aufgereinigt. Hierfür wurden zunächst etwa 5 ml Parasitenkultur (1-3 % Parasitämie) fünf Minuten bei 1300g abzentrifugiert, in 10 ml einer 2%igen Saponinlösung in PBS resuspendiert und zur Erythrozytenlyse zehn Minuten bei RT inkubiert. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 1300g wurde das Pellet durch erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen mit 30 ml PBS gewaschen und schließlich in 200 µl PBS resuspendiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des *Blood Mini Kits* gemäß Herstellerangaben. Das finale Elutionsvolumen betrug jedoch 50 µl statt 200 µl H₂O_{bidest.}

Zur Isolation genomischer DNA für Southern Blot und Klonierungen wurden 40 ml Parasitenkultur (3-5 % Parasitämie) fünf Minuten bei 1300g abzentrifugiert, in 5 ml PBS resuspendiert und zur Erythrozytenlyse fünf Minuten in 75 µl einer 10%igen Saponinlösung inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1300g wurde der Überstand verworfen und

das Pellet zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Dies geschah ebenfalls durch fünf Minuten Zentrifugation bei 1300g. Anschließend wurde das Pellet zur weiteren Zellyse in 500 µl TSE, 100 µl 10 % SDS sowie 50 µl 6 M NaClO₄ über Nacht schüttelnd inkubiert. Die DNA-Extraktion erfolgte durch Phenol/Chloroform. Dafür wurde ein Volumenanteil Phenol zum ÜN-Ansatz gegeben, dieser fünf Minuten schüttelnd inkubiert und fünf Minuten bei 16.000g abzentrifugiert. Die entstandene obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit je einem halben Volumenanteil Phenol und Chloroform versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation und ebenso langer Zentrifugation bei 16.000g wurde die wässrige Phase mit einem Volumenanteil Chloroform gewaschen. Dabei folgte der fünfminütigen Inkubation ebenfalls eine Zentrifugation bei 16.000g für fünf Minuten. Anschließend wurde der Ansatz zur DNA-Fällung mit zwei Volumenanteilen 100%igem Ethanol versetzt, fünf Minuten unter Schütteln inkubiert und unter den bisherigen Bedingungen abzentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit eiskaltem 70%igem Ethanol wurde das Pellet an der Luft getrocknet und vorsichtig in 20 µl H₂O_{bidest} resuspendiert. Eine anschließende Inkubation bei 55-60 °C erleichterte das Lösen der DNA.

2.2.2.12 Southern-Blot-Restriktionsanalyse

Ziel des Southern Blots ist es, DNA-Fragmente, die mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können. In dieser Arbeit wurde die Methode des Southern Blots verwendet, um anhand genomischer DNA der *PfCCp4*-KO-Klone L4C, O12B und P3D versus WT-DNA die stabile und korrekte Integration des KO-Konstrukts zu verifizieren (Abb. 2.15).

Zunächst wurde mit Hilfe des *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* die entsprechende Southern-Sonde hergestellt. Dafür wurde mit den eigens entworfenen Oligonukleotiden *PfCCp4KO-SS-1 sense* sowie *PfCCp4KO-SS-1 antisense* und *Pfx*-Polymerase (siehe Kapitel 2.2.2.2) ein 336-bp-großes PCR-Produkt hergestellt und über ein 1%iges Agarosegel unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 30 µl H₂O_{bidest}. Eine Probenmenge von 1 µg wurde anschließend in 16 µl H₂O_{bidest} aufgenommen und für drei Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach raschem Überführen in ein Eisbad und kurzem Anzentrifugieren, um die Probe am Gefäßboden zu sammeln, wurden 4 µl *DIG-High-Prime-Lösung* zur denaturierten Probe gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2 M EDTA gestoppt und das Gemisch anhand des *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt. Dabei erfolgte die Elution in 30 µl H₂O_{bidest}.

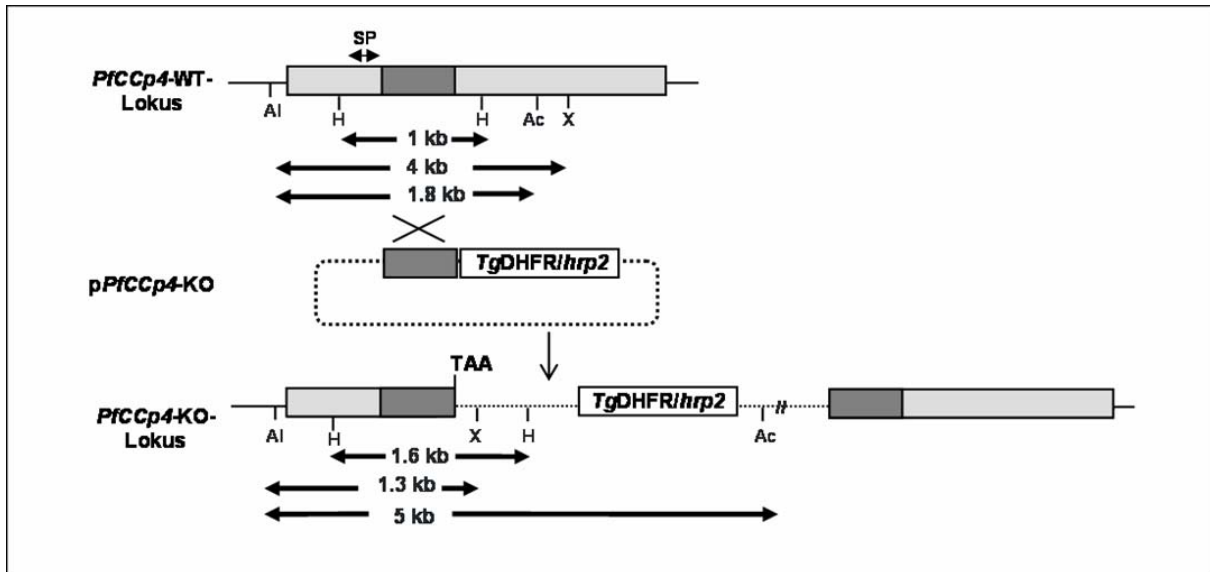


Abb. 2.15. Schema des *PfCCp4*-Genlokus vor und nach Genausschaltung. Durch Rekombination des WT-Lokus mit dem KO-Konstrukt *pPfCCp4*-KO an der homologen Region (dunkelgrau) wird der *PfCCp4*-Lokus (hellgrau) entzwei gespalten. Es entsteht eine pseudo-diploide Genanordnung mit Pyrimethamin-Resistenzkassette und eingeführtem Stopkodon (TAA). Die relative Position der Southern-Sonde (SP) und der Restriktionsschnittstellen, sowie die Größe der entstehenden DNA-Fragmente ist unterhalb der Genstruktur markiert. Al, *AleI*; H, *HindIII*; Ac, *AclI*; X, *XbaI*.²⁷

Die Konzentration von etwa 25 ng/μl wurde entsprechend Herstellerangaben des *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* ermittelt. Die optimale Hybridisierungstemperatur von 37 °C ergab sich aus folgender Gleichung:

$$T = [49,82 + 0,41 \times (\% \text{ G} + \text{ C}) - (600/\text{Länge der Sonde [bp]})] - 20 \text{ bis } 25 \text{ °C.}$$

Nach Herstellung der DIG-markierten Sonde wurde genomische DNA der *PfCCp4*-KO-Klone L4C, O12B und P3D sowie WT-DNA gemäß folgender Ansätze durch fünfstündige Inkubation bei 37 °C verdaut:

Verdau A		Verdau B		Verdau C	
DNA	3 μg	DNA	3 μg	DNA	3 μg
10 x NEB 2	3 μl	10 x NEB 4	3 μl	10 x NEB 4	3 μl
10 x BSA	3 μl	10 x BSA	3 μl	10 x BSA	3 μl
<i>HindIII</i>	2 μl	<i>AleI</i>	1 μl	<i>AleI</i>	1 μl
H ₂ O _{bidest}	ad 30 μl	<i>AclI</i>	1 μl	<i>XbaI</i>	1 μl
		H ₂ O _{bidest}	ad 30 μl	H ₂ O _{bidest}	ad 30 μl

Nach Versetzen des Verdauers mit sechsfach konzentriertem Probenpuffer wurden die DNA-Fragmente in einem 0,8%igen Agarosegel bei 150 V in einer MAXI-Kammer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde eine 1:1-Mischung aus der λ -DNA/*Hind*III- und 100-bp-DNA-Leiter verwendet. Die Spur, die den Größenstandard enthielt, wurde vor dem Blotten vom Gel abgetrennt, in Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert, um den jeweiligen DNA-Fragmenten eine spezifische Distanz zur Geltasche zuzuordnen zu können. Dies diente später bei der Auswertung der Größenbestimmung der im Southern Blot detektierten DNA-Fragmente.

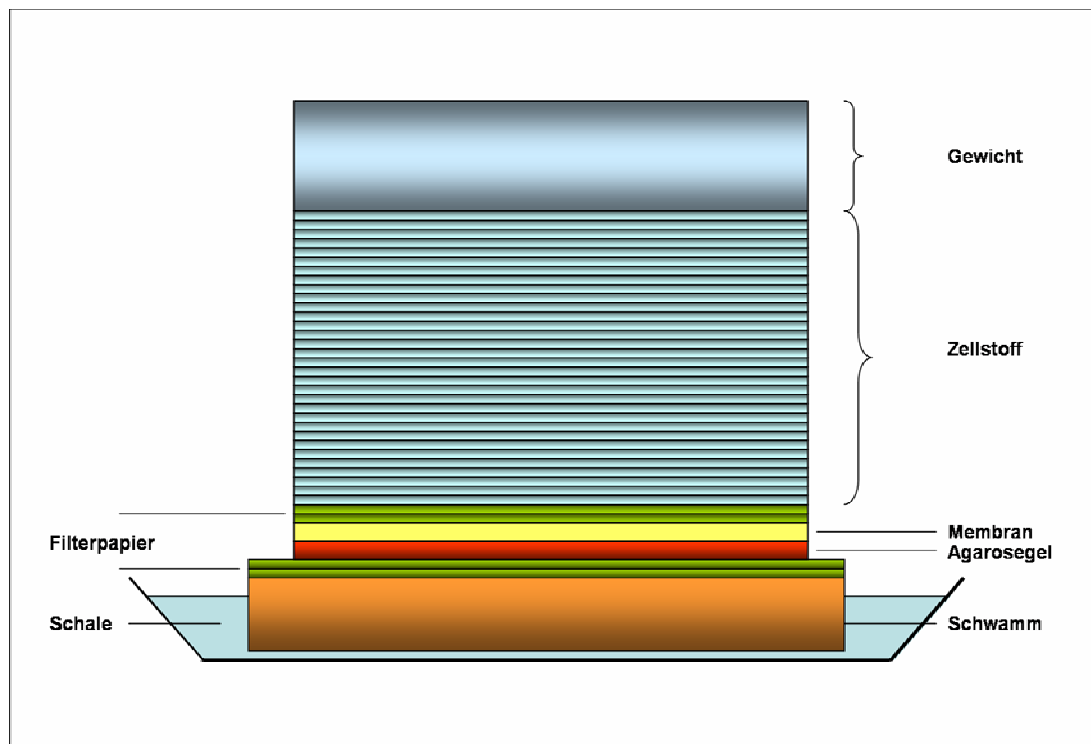


Abb. 2.16. Schema eines Southern-Blot-Aufbaus.²⁸

Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel wippend 45 Minuten in einer Lösung aus 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH inkubiert. Nach kurzem Waschen in Wasser wurde das Gel dreimal 15 Minuten in 1 M Tris/HCl (pH 7,4) mit 1,5 M NaCl neutralisiert, bevor es zum Blotten verwendet wurde. Der Southern Blot wurde dem Schema in Abb. 2.16 entsprechend aufgebaut: Ein grobporiger Schwamm wurde in eine mit 20 x SSC gefüllte Glasschale gelegt und mit zwei Schichten in 20 x SSC getränktem Whatman-Filterpapier bedeckt. Darauf wurde das Agarosegel plaziert. Die Membran Hybond N+ wurde auf Gelgröße zugeschnitten, kurz in Wasser eingelegt und anschließend fünf Minuten in 20 x SSC inkubiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Darüber wurden zwei Lagen Whatman-Filterpapier getränkt in 2 x SSC gelegt und etwa 10 cm hoch mit zugeschnittenem, trockenem Zellstoff überschichtet. Ein Gewicht schloss den Aufbau nach oben hin ab. Der Transfer erfolgte

durch Kapillarkräfte über Nacht für mindestens 16 Stunden. Beim Abbau des Blots wurden die Taschenpositionen mit einem Bleistift auf der Rückseite der Membran markiert und Gelreste vorsichtig entfernt. Das Gel wurde zur Kontrolle in Ethidiumbromid angefärbt und zeigte DNA-Reste in diffuser Verteilung, wie sie für den Verdau genomischer DNA typisch sind. Die Membran hingegen wurde mit der DNA-Seite nach oben auf einem mit 2 x SSC befeuchteten Whatman-Filterpapier gelagert. So vor dem Austrocknen geschützt wurde die DNA innerhalb von etwa zwei Minuten unter UV-Licht mit der Funktion „Auto CrossLink“ im Stratalinker[®] 1800 auf der Membran fixiert.

Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt und eine Stunde lang in 10 ml *DIG-Easy-Hyb-Puffer* pro 100 cm² unter Bewegung bei RT inkubiert. Danach wurde die DIG-markierte Sonde drei Minuten bei 95 °C denaturiert, rasch auf Eis überführt, um ein Renaturieren zu verhindern, und in einer Konzentration von 25 ng/ml *DIG-Easy-Hyb-Puffer* auf die Membran gegeben. Pro 100 cm² Membran wurden 3,5 ml *DIG-Easy-Hyb-Puffer* benötigt. Die Inkubation der in Folie eingeschweißten Membran erfolgte bei der errechneten Hybridisierungstemperatur von 37 °C über Nacht im Bakterienschüttler bei 150 Umdrehungen pro Minute. Danach wurde die Membran zweimal zehn Minuten in 2 x SSC mit 0,1 % SDS bei RT gewaschen und zweimal 30 Minuten in einer vorgewärmten Lösung aus 0,5 x SSC und 0,1 % SDS bei 52 °C unter Bewegung inkubiert, um überschüssige Sonde zu entfernen. Vor der 30-minütigen Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 50 ml Blockierungslösung wurde die Membran drei Minuten in 20 ml Waschpuffer inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation des anti-DIG-Antikörpers bei 9500g wurde dieser 1:10.000 in 20 ml Blockierungslösung verdünnt und 30 Minuten auf die Membran gegeben. Es folgten zweimal 15 Minuten Inkubation in 20 ml Waschpuffer und zweimal fünf Minuten Äquilibrierung in 20 ml Detektionslösung. Danach wurde die Membran in einer Entwicklarkassette auf eine Folie gelegt, mit 1,5 ml CSPD-Substrat versehen, mit einer weiteren Folie bedeckt und nach dem sorgfältigen Entfernen von Luftblasen fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation von fünf Minuten bei 37 °C wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, der bei RT nach ein- bis sechsstündiger Exposition im CURIX 60 Apparat entwickelt wurde. Zur Auswertung wurden die Taschenpositionen der Membran auf den entwickelten Röntgenfilm übertragen und die jeweilige Distanz von detektierter DNA-Bande zur Taschenposition gemessen. Ein Vergleich mit den Werten des vorher eingefärbten Größenstandards diente zur Ermittlung der Fragmentgrößen.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Expression rekombinanter Proteine

Die in dieser Arbeit durchgeführten Proteinexpressionen erfolgten mit Hilfe eines T7-Promotors, der sowohl im pSUMO/pSMT3- als auch im pGEX-4T-1-Vektor unter der Kontrolle eines *lac*-Operons stand und nach dem Prinzip der Substratinduktion aktiviert wurde. Zur Inaktivierung des *lac*-Repressors wurde IPTG verwendet.

Proteinexpression im kleinen Maßstab (Mini-Expression)

Die Mini-Expression rekombinanter Proteine im bakteriellen System diente im Rahmen dieser Arbeit der Expressionsanalyse neu klonierter, jedoch bereits sequenzierter *PfCCp4*-Konstrukte. Dazu wurden von einer Platte frisch transformierter BL21-CodonPlus[®]-(DE3)-RIL-Expressionszellen (siehe Kapitel 2.2.1.4) mehrere Klone mit einer sterilen Pipettenspitze in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Kultur in einem Doppelansatz 1:5 in frischem LB-Medium mit Antibiotikum verdünnt und eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,75 mM IPTG in eines der Doppelansatz-Röhrchen (+IPTG), während das zweite Röhrchen (-IPTG) ausschließlich als Negativkontrolle mitgeführt wurde. Nach zwei bis drei Stunden wurden 30 µl jeder Kultur abgenommen, 1:1 mit Probenpuffer und 25 mM DTT versetzt und zur Denaturierung der Proteinstruktur zehn Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurden danach entweder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.3.3) und nach dem Gellauf gefärbt (siehe Kapitel 2.2.3.4) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Proteinexpression im größeren Maßstab (Maxi-Expression)

Nach erfolgreicher Mini-Expression wurden die rekombinanten Proteine entweder zur Herstellung polyklonaler Antikörper oder für Interaktionsstudien in größerem Maßstab exprimiert. Dafür wurden von einer Platte frisch transformierter BL21-CodonPlus[®]-(DE3)-RIL-Expressionszellen (siehe Kapitel 2.2.1.4) mehrere Klone mit einer sterilen Pipettenspitze in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Verdünnen der Kultur erfolgte in einem Liter frischem LB-Medium mit Antibiotikum, die weitere Inkubation eineinhalb Stunden bei 37 °C. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Inkubationstemperatur auf RT gesenkt, die Kultur weitere 30 Minuten geschüttelt und anschließend mit 0,75 mM IPTG induziert. Es folgte eine Inkubationszeit von vier Stunden bei RT. Die niedrigere Temperatur diente dabei der langsameren und somit präziseren Expression bzw. Faltung der rekombinanten Proteine; der

vom pSUMO/pSMT3-Vektor kodierte SUMO-Anteil unterstützt zusätzlich durch seine Chaperonfunktion die korrekte Faltung seiner Fusionsproteine. Zum Ernten wurden die Zellen jeweils zehn Minuten bei 5000g abzentrifugiert und entweder als Bakterienpellet bei -20 °C gelagert oder zur Proteinisolation wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben weiterbehandelt.

2.2.3.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Proteinisolation für die Herstellung von Antikörpern bzw. für Zelladhäsionsstudien erfolgte entweder über das 6His-Fusionspeptid bei den pSUMO/pSMT3-Konstrukten oder über das GST-Fusionspeptid bei pGEX-4T-1-Konstrukten. Als weitere Alternative bei geringer Expressionsrate der rekombinanten Proteine wurde für die Antikörperherstellung eine Aufreinigung als *Inclusion Bodies* gewählt. Für Interaktionsstudien mittels Affinitätschromatographie wurde das unbearbeitete Proteingemisch nach Bakterienzellyse verwendet. Alle Arbeiten wurden entweder auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt, alle Lösungen und Puffer wurden vorgekühlt.

Aufreinigung von 6His/SUMO-fusionierten rekombinanten Proteinen

Nach Maxi-Expression und Ernten der Bakterien (siehe Kapitel 2.2.3.1) wurde das Zellpellet in 20 ml einer Lösung aus 50 mM Tris pH 8,0 und 10 % Glycerin auf Eis resuspendiert, mit Lysepuffer (siehe Kapitel 2.1.4) vermischt und eine Stunde bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die angedauten Zellen wurden daraufhin mit Hilfe einer French[®] Press in drei Zyklen bei einem Druck von 1200 psi vollständig aufgebrochen und die DNA durch zweiminütige Ultraschallbehandlung bei 50 % Intensität und der Einstellung „Zyklus 50“ zerstört. Es folgte eine Stunde Zentrifugation bei 30.000g und Separation des proteinhaltigen Überstandes von den Zellresten. Die Proteinlösung wurde anschließend mit 500 µl behutsam gewaschener Nickel-NTA-Agarose versetzt und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Das Gemisch wurde auf eine PolyPrep[®]-Säule gegeben und zweimal mit Waschpuffer 3 gewaschen. Danach wurde die Säule einmal mit Waschpuffer 4, zweimal mit Waschpuffer 3, einmal mit Waschpuffer 5 und dreimal mit Waschpuffer 3 gespült, um unspezifisch gebundene Proteine durch den variierenden Imidazolgehalt der Puffer zu entfernen. Die Elution erfolgte in dreimal 1 ml Elutionspuffer, die Bestimmung der Ausbeute und des Reinheitsgrades durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; siehe Kapitel 2.2.3.3-4). Der Elutionspuffer wurde durch Waschen über Amicon[®] Ultra-4- bzw. Ultra-15-Zentrifugenfiltereinheiten gegen Dialyse-PBS ausgetauscht. Anschließend wurde die Konzentration der rekombinanten Proteine erneut durch SDS-PAGE bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Proben bei -20 °C.

Aufreinigung von GST-fusionierten rekombinanten Proteinen

Bei der GST-Aufreinigung entsprachen die Schritte der Maxi-Expression, Zellernte, Lyse durch Lysepuffer, Behandlung mit French[®] Press und Ultraschall gefolgt von Zentrifugation denen der 6His/SUMO-Aufreinigung. Der proteinhaltige Überstand wurde anschließend mit 500 µl behutsam gewaschener Glutathion-Sepharose-4FastFlow versetzt und rotierend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Gemisch wurde auf eine PolyPrep[®]-Säule gegeben und zweimal mit Waschpuffer 3, einmal mit Waschpuffer 4 und dreimal mit Waschpuffer 3 gewaschen. Die Elution erfolgte wie zuvor in dreimal 1 ml Elutionspuffer. Die Ausbeute und der Reinheitsgrad wurden durch SDS-PAGE bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.3-4). Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Aufreinigung als *Inclusion Bodies*

Agrund geringer Ausbeute sowohl bei der Aufreinigung von 6His/SUMO- als auch GST-Fusionsproteinen wurden ein Teil der rekombinanten Proteine zur Antikörperherstellung als *Inclusion Bodies* nach einem Protokoll der Firma ImmunoGlobe (Himmelstadt) isoliert. Bei *Inclusion Bodies* handelt es sich um Präzipitate aus denaturierten Peptiden, die sich während der Überexpression in bakteriellen Zellen bilden und von keiner Membran umschlossen sind.

Nach Maxi-Expression und Ernten der Zellen (s. o.) wurde das Pellet in 80 ml Lysepuffer resuspendiert, mit 200 mg Lysozym in 20 ml Lysepuffer versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch zehn Minuten Ultraschallbehandlung bei einer Intensität von 50 % und der Einstellung „Zyklus 50“ aufgeschlossen und mit 200 ml Detergenzpuffer vermischt. Nach zehn Minuten Zentrifugation bei 5000g wurde der leicht gelbliche Überstand verworfen, das Pellet in 200 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut zehn Minuten bei 5000g zentrifugiert. Der milchige Überstand wurde abgenommen und der vorige Waschschrift sofort wiederholt, bis sich ein festes Pellet gebildet hatte. Dieses wurde daraufhin in 200 ml 70%igem Ethanol (p. a.) gewaschen und schließlich in 5 ml PBS solange mit Ultraschall behandelt, bis es mühelos eine 23-G-Nadel passieren konnte. Die Reinheit und Konzentration wurde abschließend mittels SDS-PAGE bestimmt, die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine einfache Methode, Proteingemische in ihre einzelnen Komponenten aufzutrennen, die im elektrischen Feld aufgrund ihrer variierenden Größe unterschiedliches Laufverhalten zeigen. Das stark anionische Detergenz Natrium-

dodecylsulfat (SDS) sorgt neben dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol für die Linearisierung der Proteine und verleiht ihnen eine einheitlich negative Ladung. Dies bewirkt, dass die Proteine bei Anlegen einer Spannung in Richtung Anode wandern. Die Laufgeschwindigkeit ist dabei abhängig vom Molekulargewicht des jeweiligen Proteins – leichtere Proteine können sich schneller durch das Netz aus Polyacrylamid (PAA) bewegen als schwerere. Die PAA-Konzentration wird der Größe des Zielproteins angepasst. Je leichter das entscheidende Protein ist, desto größer sollte die PAA-Konzentration des Gels sein, um immer kleinere Maschen im PAA-Netz zu erreichen. Das Trenngel, in dem sich die Proteine entsprechend ihrer Größe auffächern, wird in der Regel mit einem Sammelgel überschichtet. Dieses weitmaschige Gel schafft durch seinen vom Trenngel abweichenden pH-Wert eine einheitliche, scharf umrissene Lauffront der Proteine am Übergang zum Trenngel. In dieser Arbeit wurden für Proteine mit hohem Molekulargewicht (> 300 kDa) hauptsächlich 5%ige und 7%ige Trenngele verwendet, für Proteine im mittleren Größenbereich (180 kDa bis 30 kDa) 12%ige Trenngele und für kleine Proteine (< 30 kDa) 15%ige Trenngele. Bis auf das 5%ige Trenngel wurden alle Gele mit einem 5%igen Sammelgel kombiniert. Als Polymerisationsstarter wurde 10 % APS verwendet, als Radikalstabilisator TEMED. Beide Komponenten wurden erst kurz vor dem Gießen der Gele in die entsprechenden Puffermischungen (siehe Kapitel 2.1.4) gegeben, um ein vorzeitiges Polymerisieren der Lösungen zu verhindern. Zuerst wurde die vollständige Trenngelpuffermischung in eine Mini-Protean-3-Station zwischen zwei Glasplatten gegossen, die einen Zwischenraum von 1,0 mm umschlossen (Abb. 2.17). Danach wurde der Ansatz für eine klare Trennlinie mit Wasser überschichtet und 20 Minuten bei RT auspolymerisiert. Das Wasser wurde anschließend abgegossen, das frische Sammelgelmisch auf das auspolymerisierte Trenngel gegeben und mit einem Kamm zur Taschenbildung versehen. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT wurde das Gel in eine Mini-Protean-3-Apparatur eingespannt und der Kamm erst nach Füllen der Elektrophoresekammer mit 1 x Laufpuffer gelöst. Vor Auftragen der Proben wurden diese mit einem 1:1-Gemisch aus Probenpuffer und 25 mM DTT versetzt, zehn Minuten bei 95 °C denaturiert, kurz auf Eis gelagert und anschließend in die Taschen gefüllt. Als Kontrolle diente ein Molekulargewichtsstandard mit Proteinen bekannter Größe (siehe Kapitel 2.1.9). Um die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel zu optimieren, wurde die Elektrophorese zunächst 20 Minuten bei 85 V gestartet und schließlich eineinhalb Stunden bei 125 V fortgesetzt. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine bzw. Zellysate wurden entweder zur Bestimmung der Überexpression, des Reinheitsgrades und der Konzentration nach Aufreinigung angefärbt (siehe Kapitel 2.2.3.4) oder für Immundetektionen im Western Blot (siehe Kapitel 2.2.3.6) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

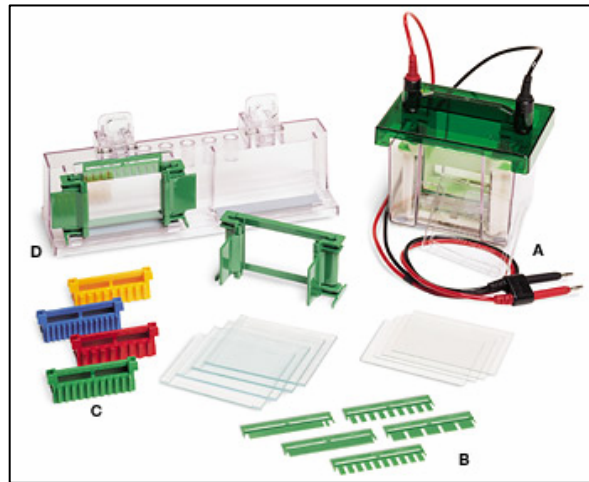


Abb. 2.17. Komponenten der Mini-Protean-3-Apparatur von Bio-Rad. A. Elektrophoresekammer. B. Kämme zur Taschenformung. C. Gelbeladungshilfen. D. Gießstation.²⁹

2.2.3.4 SDS-Gelfärbung, Bestimmung der Proteinkonzentration und SDS-Gel-Konservierung

Zur Gelfärbung wurde das SDS-Gel dreimal fünf Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und anschließend eine Stunde in *GelCode[®]-Blue-Stain* schüttelnd bei RT inkubiert. Danach wurde das Gel solange in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen, bis überschüssige Färbelösung entfernt und klare Proteinbanden sichtbar wurden.

Die Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Proteine erfolgte durch visuelle Evaluation der Farbdichte der gewünschten Proteinbanden im Vergleich zum Größenstandard. Wurden 5 μl des Proteingrößenstandards aufgetragen, entsprach jede seiner Proteinbanden laut Hersteller 1 μg .

Zur Trocknung gefärbter Gele wurden diese zunächst eine halbe Stunde in 20%igem Ethanol mit einem Anteil von 10 % Glycerin äquilibriert und anschließend zwischen zwei in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gequollene Zellophanfolien in einen Trocknungsrahmen gespannt. Ein Tag Trocknen bei RT genügte, um den Gelen jegliche Flüssigkeit zu entziehen und sie dadurch dauerhaft zu konservieren.

2.2.3.5 Western-Blot-Analyse

Diese Methode bildet einen Folgeschritt zur SDS-PAGE. Sie stellt den Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels elektrischer Spannung dar, gefolgt von einer Immundetektion.

Dazu wurden zunächst die zwei Glasplatten der SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.3.3) vorsichtig voneinander getrennt und das Sammelgel vom Trenngel gelöst. Anschließend wurde das Trenngel von der Glasplatte genommen und zusammen mit der Nitrozellulosemembran Hybond ECL in die Mini-Trans-Blot-Apparatur entsprechend Abb. 2.18 überführt.

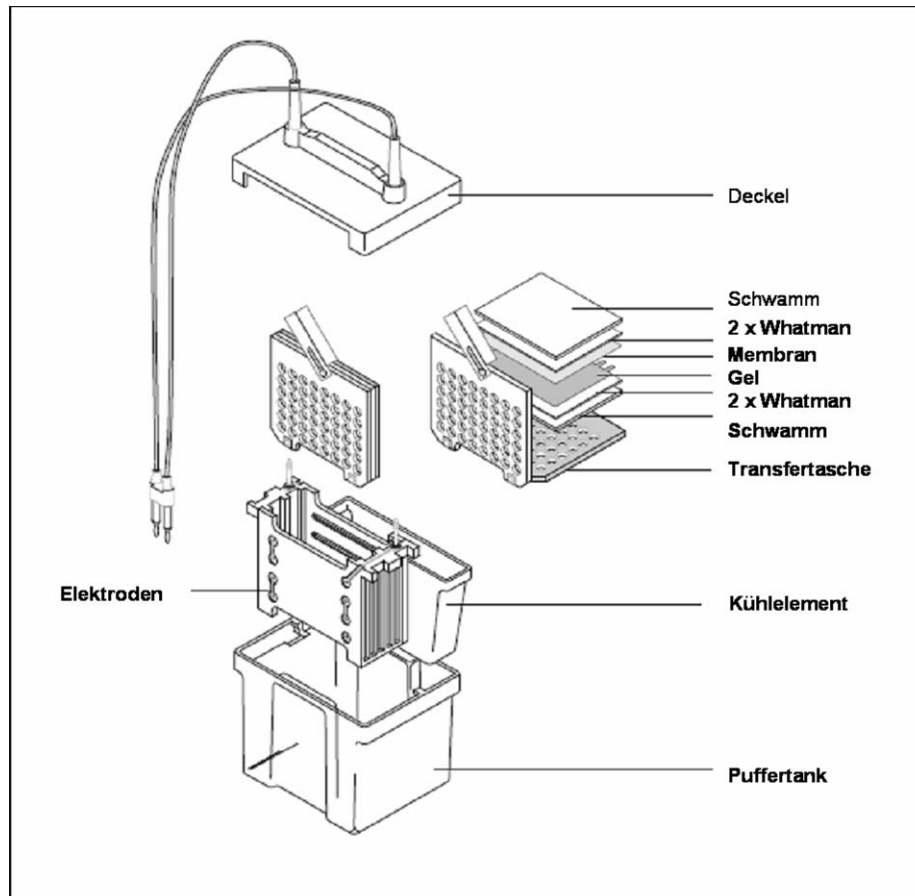


Abb. 2.18. Aufbau eines Western Blots anhand der Mini-Trans-Blot-Apparatur von Bio-Rad.³⁰

Auf die schwarze Lasche der Transfertasche wurde zunächst ein in Transferpuffer getränkter Schwamm gelegt, bedeckt von zwei in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren. Es folgte das Gel, die Membran, zwei weitere Whatman-Filterpapiere und ein weiterer Schwamm. Beim Aufbau wurde stets auf eine luftblasenfreie Schichtung und ausreichende Benetzung der Komponenten mit Transferpuffer geachtet. Nach Schließen der Transfertasche wurde diese in die entsprechende Halterung eingesetzt (Membranorientierung Richtung schwarzer Anode), in den Puffertank gegeben und zusammen mit einem Kühlelement mit Transferpuffer überschichtet. Der Proteintransfer erfolgte nach dem *wet*-Prinzip bei 25 V für zwei Stunden oder bei 15 V über Nacht. Danach wurde die Membran in eine Plastikschaale überführt, kurz in TBS geschwenkt und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1 % BSA in 5 % TBBSM versetzt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C, gefolgt von zwei zehnmütigen Waschschrinen in TBS. Der

Primärantikörper, verdünnt in 3 % TBSM, wurde anschließend zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C zur Membran gegeben. Überschüssiger Antikörper wurde durch fünf Minuten Waschen in 3 % TBSM, zweimal zehn Minuten Waschen in 3 % TBSM mit 0,1 % Tween und ein letztes Mal fünf Minuten Waschen in 3 % TBSM entfernt. Der Sekundärantikörper, gekoppelt an ALP und verdünnt in 3 % TBSM, wurde eine Stunde bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde einmal zehn Minuten mit TBS gewaschen, gefolgt von zweimal zehn Minuten Waschen mit 0,1 % Tween in TBS und einem weiteren zehnmütigen Waschschrift in TBS. Die Membran wurde anschließend für drei Minuten wippend mit Äquilibriumspuffer inkubiert, bevor die Immundetektion erfolgte. Dies geschah durch Applikation des ALP-Substrats NBT/BCIP, von dem eine Tablette jeweils in 10 ml H₂O_{bidest} gelöst wurde. Nach zwei Minuten bis zwei Stunden wurde die Farbreaktion - bedingt durch die Bildung lilafarbenen Präzipitats an der Stelle der Antikörperbindung - durch 20-minütiges Schwenken in Stoppuffer beendet. Abschließend wurde die Membran zwischen zwei Lagen Zellulosepapier getrocknet.

2.2.3.6 Interaktionsstudien

Zur Funktionsanalyse der PfCCp-Proteine wurden Interaktionsstudien durchgeführt. Dabei dienten einerseits Affinitätschromatographien der Überprüfung direkter Wechselwirkungen rekombinanter PfCCp-Domänen; andererseits wurden in Ko-Immünpräzipitationsstudien die Interaktionen von nativen PfCCp-Proteinen untereinander bzw. zwischen PfCCp-Proteinen und anderen sexualstadienspezifischen Proteinen untersucht. In einer dritten Versuchsreihe wurde das Bindungsverhalten von rekombinanten PfCCp-Proteinen an Sexualstadien von *P. falciparum* analysiert. Alle Arbeiten wurden, falls nicht anders angegeben, entweder auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt, um die Degradierung der Proteine zu minimieren.

Affinitätschromatographiestudien

Die Affinitätschromatographiestudien erfolgten nach dem Köder-Beute-Prinzip (Abb. 2.19). Dafür wurden in unserem Labor eine Reihe rekombinanter PfCCp-Domänen kloniert und als GST-Fusionsproteine wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben in einer Maxi-Expression hergestellt. Die Zellyse erfolgte durch Lysepuffer, drei Zyklen French[®] Press sowie zweiminütige Ultraschallbehandlung bei einer Intensität von 50 %. Durch Zentrifugation wurden die Proteine vom übrigen Zellmaterial getrennt (siehe Kapitel 2.2.3.2) und anschließend mit 500 µl Glutathion-Sepharose über Nacht rotierend bei 4 °C inkubiert. Das Proteingemisch wurde auf eine PolyPrep[®]-Säule gegeben, wobei sich die an Glutathion-Sepharose gebundenen Fusionsproteine am Boden der Säule sammelten, während ungebundene

Proteine bei den folgenden drei Waschungen mit PBS ausgespült wurden. Nach dieser Konzentrierung und Reinigung der GST-Fusionsproteine wurden sie jeweils mit 6His/SUMO-fusionierten *PfCCp*-Proteinen versetzt. Die Säule wurde anschließend fünfmal mit PBS gewaschen und die Elution erfolgte dreimal in jeweils 500 µl Elutionspuffer, der reduziertes Glutathion enthielt.

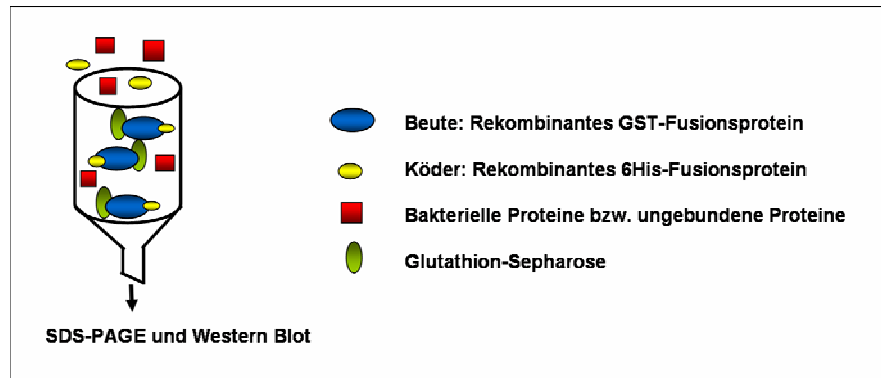


Abb. 2.19. Schemadarstellung einer Affinitätschromatographie nach dem Köder-Beute-Prinzip.³¹

Kam es zu einer Proteininteraktion, konnten in der anschließenden Western-Blot-Analyse sowohl das GST-Fusionsprotein (Köder) als auch das gebundene 6His/SUMO-Fusionsprotein (Beute) aufgrund gemeinsamer Elution detektiert werden. Bei mangelnder Interaktion kam es durch das Auswaschen der 6His/SUMO-Fusionsproteine zu keiner Ko-Elution; der Western Blot zeigte in diesem Fall bei der 6His-Detektion keine Bande. Analysiert wurden auf diese Weise nicht nur die drei Fraktionen der Elution, sondern auch der Durchfluss des letzten Waschschrittes vor der Elution. Eine ausreichende Proteinexpression wurde jeweils durch SDS-PAGE mittels Gelfärbung überprüft und stets als Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrollen dienten Affinitätschromatographien an dem GST-Peptid alleine mit dem potentiellen 6His/SUMO-Interaktionspartner bzw. an GST-Fusionsproteinen mit dem 6His/SUMO-Peptid alleine. Eine Bindung der Fusionspeptide untereinander wurde ebenso ausgeschlossen.

Ko-Immunpräzipitationen

Zum Nachweis von Proteininteraktionen durch Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) wurde anhand eines spezifischen Antikörpers und ProteinG-*beads* das gewünschte Protein mit all seinen Interaktionspartnern aus Gametozytenlysat präzipitiert (Abb. 2.20). Die auf diese Weise isolierten Proteine wurden durch Western Blot analysiert.

Zur Zelllyse der aufgereinigten Gametozyten in PBS-Mix (siehe Kapitel 2.2.1.8) wurden diese mit einem Zellhomogenisator sowie durch eine Minute Ultraschallbehandlung bei 50 % Intensität und der Einstellung „Zyklus 50“ aufgeschlossen. Feste Zellbestandteile wurden

zwei Minuten lang bei 16.000g abzentrifugiert, und der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

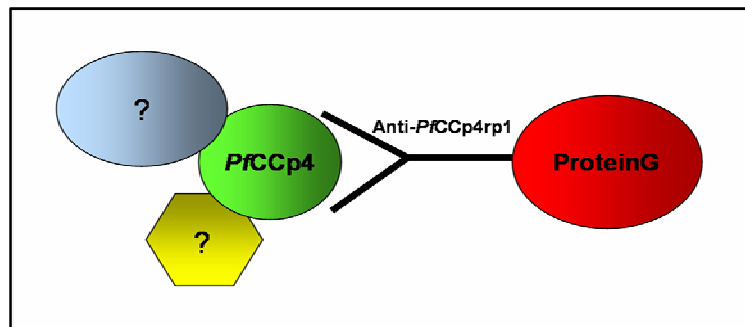


Abb. 2.20. Prinzip der Ko-Immünpräzipitation am Beispiel von *PfCCp4*.³²

Um unspezifisch bindende Bestandteile zu entfernen, wurde das Proteingemisch zunächst unter Rotation 30 Minuten mit 10 % neutralem Mausserum gemischt. Anschließend wurden 20 µl ProteinG-beads hinzu gegeben und es folgten weitere 30 Minuten Inkubation unter Rotation. Nach erneuter Zentrifugation wurde der vorgereinigte Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit dem gewünschten Antikörper (siehe Tab. 2.7) eine Stunde unter Rotation inkubiert.

Tab. 2.7. Auflistung der in Ko-Immünpräzipitationsstudien eingesetzten Antikörpervolumina

Anti- <i>PfCCp4rp1</i>	16 µl
Anti- <i>Pfs230</i> C-term.	5 µl
Anti- <i>Pfs48/45</i>	5 µl
Anti- <i>Pf39</i>	8 µl

Nach Zugabe von 20 µl ProteinG-beads wurde der Ansatz zwei Stunden bei 4 °C unter Rotation inkubiert und das Präzipitat durch fünfminütige Zentrifugation bei 3400g sedimentiert. Es folgten mindestens drei Waschschrte in PBS, indem der Ansatz jeweils fünf Minuten bei 3400g zentrifugiert und das Pellet in frischem PBS resuspendiert wurde. Schließlich wurde das Präzipitat in ein 1:1-Gemisch aus PBS und Probenpuffer mit 25 mM DTT aufgenommen (30 µl pro aufgereinigter Gametozytenflasche). Die Analyse der Interaktionspartner erfolgte durch spezifische Immundetektion mittels Western Blot (siehe Kapitel 2.2.3.4-5). Als Negativkontrollen dienten Ko-IP-Versuche unter Verwendung von anti-*Pf39*- bzw. anti-alpha-Tubulin-II-Antiserum. Bei *Pf39* handelt es sich um ein Protein des ER, das somit keine Interaktion mit Proteinen der parasitophoren Vakuole zeigen sollte (Templeton *et al.*, 1997). Gleiches gilt für das intrazelluläre Protein männlicher Gametozyten und Gameten *Pf*alpha-Tubulin-II (Rawlings *et al.*, 1992).

Zelladhäsionsstudien

In diesem Versuchsansatz wurde die Affinität von aufgereinigten, rekombinanten PfCCp-Proteinen an Sexualstadien von *P. falciparum* untersucht. Dafür wurden fluoreszierende, carboxyl-modifizierte Latex-beads mit einem Durchmesser von 1 µm zunächst aktiviert. Dies geschah durch Inkubation von 5×10^7 beads in 50 µl einer wässrigen 500-mM-MES-Lösung (pH 5-6), der 40 µl einer 100-mg/ml-Lösung EDAC und soviel H_2O_{bidest} zugegeben wurde, dass ein Endvolumen von 500 µl erreicht wurde. Das Gemisch wurde zwei Stunden lichtgeschützt und wippend bei RT inkubiert. Danach wurden die beads zweimal mit 50 mM MES durch einminütige Zentrifugation bei 16.000g gewaschen, bevor sie in 50 µl einer 50-mM-MES-Lösung resuspendiert wurden. Zur Beschichtung wurden sie mit 5 µg rekombinantem Protein in einem Maximalvolumen von 150 µl versetzt und zwei Stunden lichtgeschützt und wippend bei RT inkubiert. Es schlossen sich drei Waschschriffe mit 1 % BSA und 0,05 % Tween in PBS an, um ungebundene Proteine auszuwaschen. Das Waschen erfolgte durch einminütige Zentrifugation der Proben bei 16.000g. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde durch Inkubation in 1 % BSA und 0,05 % Tween in PBS über Nacht bei 4 °C erreicht. Danach wurden die beschichteten beads durch Zentrifugation (s. o.) dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen und in 50 µl PBS resuspendiert. Eine Lagerung der beschichteten beads war bis zu einer Woche bei 4 °C möglich.

Parallel dazu wurde zunächst 1 ml einer reifen WT-Gametozytenkultur eine Minute bei 3400g abzentrifugiert, in 20 µl PBS resuspendiert und zur Induktion der Exflagellation mit 100 µM Xanthurensäure versetzt. Nach 20 Minuten wurde der Ansatz mikroskopisch begutachtet und bei einem Reifegrad von mindestens drei Exflagellationszentren pro Gesichtsfeld über Nacht bei 4 °C durch Zugabe von 1 ml einer 4%igen PFA-Lösung fixiert.

Pro Zelladhäsionsansatz wurden anschließend 50 µl der fixierten Zellen in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und schließlich in 25 µl beschichteten beads resuspendiert. Zuvor wurden die beads zur Vermeidung von Aggregatbildung zehn Sekunden bei einer Intensität von 50 % und der Einstellung „Zyklus 50“ mit Ultraschall behandelt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden etwa 15 µl des Zellen-bead-Gemisches auf einen Objektträger transferiert, mit einem Deckgläschen versehen und mit Nagellack versiegelt. Die Zelldichte betrug dabei etwa 100 bis 150 Zellen pro Gesichtsfeld.

Die Quantifizierung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung unter Ölimmersion. Es wurden in mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen pro rekombinantem Protein jeweils zwanzig Gesichtsfelder ausgezählt. Dabei wurde sowohl der Anteil von beads-gebundenen Erythrozyten als auch der Anteil von beads-gebundenen Makrogameten pro Gesichtsfeld untersucht. Als Negativkontrollen diente das GST-Peptid alleine sowie das 6His-

Fusionsprotein 5-Helix aus dem HI-Virus (Koshiba und Chan, 2003), da das 6His/SUMO-Peptid alleine durch Aggregatbildung der beschichteten *beads* ein Auszählen verhinderte.

2.2.3.7 Herstellung von Antikörpern

Vorraussetzung für einen Großteil der hier durchgeführten Analysen war die Herstellung spezifischer PfCCp4-Antikörper. Nach Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter PfCCp4-Proteine wurden *Inclusion Bodies* von PfCCp4rp1, PfCCp4rp2, PfCCp4rp3, PfCCp4rp4, dem GST- sowie dem 6His/SUMO-Peptid dazu verwendet, Immunreaktionen in jeweils drei Mäusen zu induzieren.

Dafür wurden 300 µg rekombinantes Protein in sterilfiltriertes PBS aufgenommen und in einem Endvolumen von 500 µl in einem 1:1-Verhältnis mit Freund's-*incomplete*-Adjuvans versetzt. Das Gemisch wurde anschließend weiblichen, sechs Wochen alten NMRI-Mäusen in drei Depots zu je 100 µg subdermal injiziert. Nach vier Wochen folgte eine zweite Immunisierung, nach zehn weiteren Tagen die Blutung durch Punktur des Herzmuskels. Die Betäubung der Mäuse erfolgte dabei durch Ketamin/Xylazin nach Herstellerangaben. Das Blut (1,5 bis 2 ml) ruhte zur Gerinnung und Phasentrennung eine Stunde bei RT und wurde anschließend zehn Minuten bei 1300g abzentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und in Western-Blot-Analysen am entsprechenden rekombinanten Protein bzw. Parasitenlysat getestet oder für Immunfluoreszenzstudien verwendet. Die Antiseren wurden bei -20 °C gelagert. Parallel zur Eigenproduktion polyklonaler Mausseren wurde die Synthese der polyklonalen Peptidantikörper PfCCp4pt1 (ILNRDKEMKKQKEK) in einem Kaninchen und PfCCp4pt2 (KKKNPTSTPSDDEE) in zwei Mäusen bei der Firma Biogenes (Berlin) in Auftrag gegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von *PfCCp4* im Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

3.1.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter *PfCCp4*-Proteine

Vorbereitende Arbeiten zur Untersuchung der *PfCCp4*-Expression auf Proteinebene beinhalteten die Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter *PfCCp4*-Proteine im Hinblick auf eine polyklonale Antikörperproduktion in Mäusen. Dabei wurden domänen-überspannende *PfCCp4*-Regionen anhand von gDNA amplifiziert und jeweils über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI sowie *Not*I in einen Expressionsvektor eingefügt (siehe Kapitel 2.2.2.2 bis 2.2.2.10). Bei den verwendeten Vektoren handelte es sich um pSUMO/pSMT3 (6His/SUMO-Fusionspeptid) bzw. pGex-4T-1 (GST-Fusionspeptid). In Abb. 3.1 ist die relative Position der *PfCCp4*-Fragmente schematisch dargestellt. Tab. 3.1 gibt Aufschluss über ihre Größe.

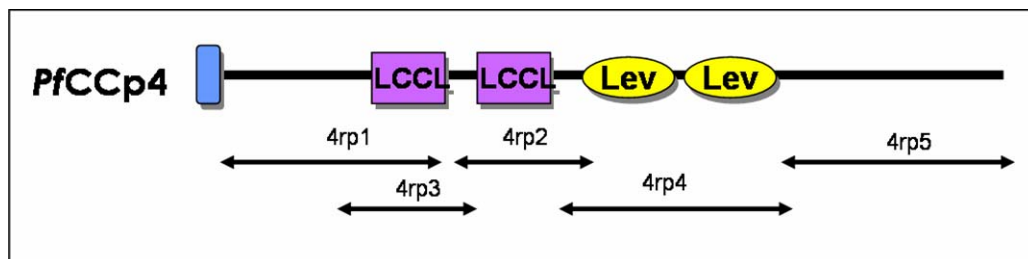


Abb. 3.1. Relative Position der rekombinanten *PfCCp4*-Fragmente.³³

Tab. 3.1. Größe der rekombinanten *PfCCp4*-Fragmente

	Fragmentgröße in bp	Fragmentgröße in kDa inkl. GST-Peptid (26 kDa)	Fragmentgröße in kDa inkl. 6His/SUMO-Peptid (13 kDa)
<i>PfCCp4rp1</i>	1240	71	58
<i>PfCCp4rp2</i>	706	52	39
<i>PfCCp4rp3</i>	725	53	-
<i>PfCCp4rp4</i>	1397	77	-
<i>PfCCp4rp5</i>	886	58	-

Die Kontrolle der Nukleinsäureabfolge nach Herstellung der rekombinanten *PfCCp4*-Konstrukte bestätigte vier korrekte Klone für *PfCCp4rp1*-pGex, jeweils drei korrekte Klone für *PfCCp4rp2*-pGex und *PfCCp4rp2*-pSUMO/pSMT3 sowie jeweils einen korrekten Klon für *PfCCp4rp3*-pGex, *PfCCp4rp4*-pGex und *PfCCp4rp5*-pGex.

3.1.1.1 Expression rekombinanter *PfCCp4*-Proteine

Das Expressionsvermögen der erhaltenen *PfCCp4*-Klone wurde durch Mini-Expression untersucht. Dazu wurden die Konstrukte in BL21-(DE3)-RIL-Zellen transformiert und durch IPTG-Zugabe induziert (siehe Kapitel 2.2.3.1). Die Analyse der Proteinüberexpression erfolgte durch SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.3.3-4). Alle vier Klone des *PfCCp4rp1*-pGex-Konstrukts zeigten nach Induktion eine nur sehr schwache Proteinbande auf Höhe des errechneten Molekulargewichts von 71 kDa (Abb. 3.2).

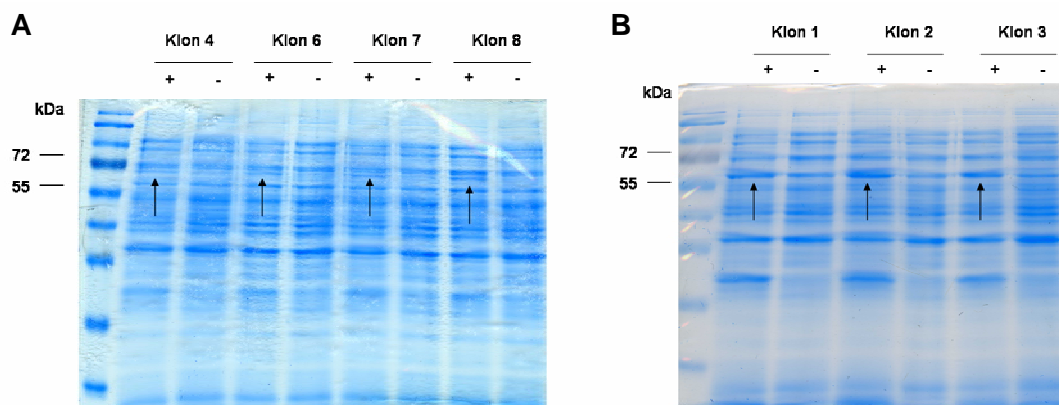


Abb. 3.2. Expressionskontrolle von *PfCCp4rp1*. A. Die vier untersuchten Klone des *PfCCp4rp1*-pGex-Konstrukts exprimierten nach IPTG-Induktion nur sehr schwach ein Protein entsprechend des errechneten Molekulargewichts von 71 kDa. B. Eine deutliche Expression von *PfCCp4rp1*-6His/SUMO (58 kDa) war in drei verschiedenen Klonen zu beobachten. +, IPTG-induziert; -, keine Induktion; Pfeil, überexprimiertes Protein.³⁴

Da die Proteinaufreinigung nach Maxi-Expression von *PfCCp4rp1*-GST eine nur sehr begrenzte Ausbeute lieferte, konzentrierten sich weitere Schritte auf die Überexpression und Aufreinigung von *PfCCp4rp1*-6His/SUMO; das zugehörige Konstrukt stand in unserem Labor bereits zur Verfügung.

Alle drei Klone des *PfCCp4rp2*-pGex-Konstrukts exprimierten ihr rekombinantes Protein ebenfalls nur sehr schwach. Zudem migrierte das detektierte Protein höher als erwartet. Für das Konstrukt *PfCCp4rp2*-pSUMO/pSMT3 war auch nach mehrmaliger Wiederholung keine Expression von *PfCCp4rp2*-6His/SUMO erkennbar (Abb. 3.3).

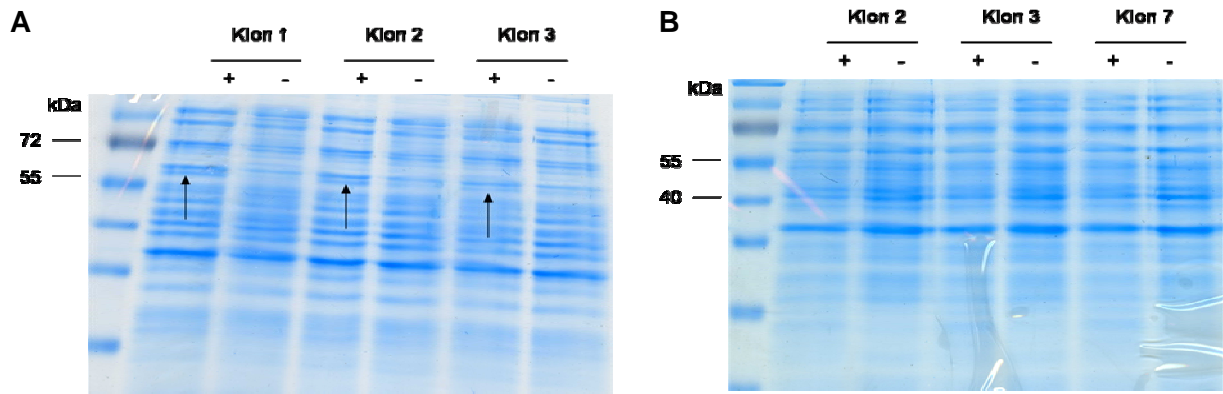


Abb. 3.3. Expressionskontrolle von *PflCCp4rp2*. A. Die drei untersuchten Klone des *PflCCp4rp2*-pGex-Konstrukts exprimierten nach IPTG-Induktion schwach ein Protein (Pfeil), das ein etwas höheres Molekulargewicht aufwies, als errechnet (52 kDa). B. Für die *PflCCp4rp2*-pSUMO/pSMT3-Klone war keine Expression detektierbar. +, IPTG-induziert; -, keine Induktion.³⁵

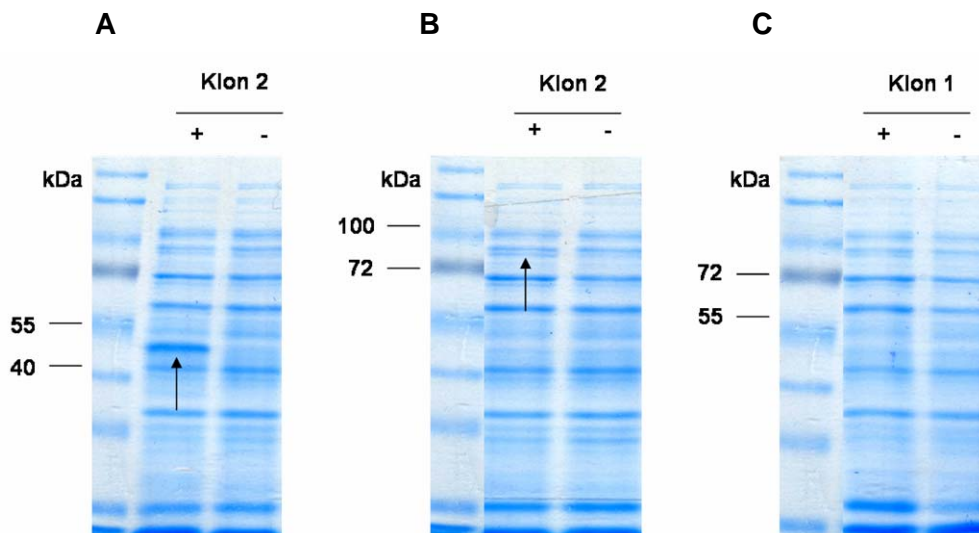


Abb. 3.4. Expressionskontrolle der Konstrukte *PflCCp4rp3*-pGex, *PflCCp4rp4*-pGex und *PflCCp4rp5*-pGex. A. Das überexprimierte Protein *PflCCp4rp3*-GST (Pfeil) migrierte entsprechend des errechneten Molekulargewichts von 53 kDa. B. Das *PflCCp4rp4*-pGex-Konstrukt zeigte eine schwache Überexpression von *PflCCp4rp4*-GST. Die Proteinbande befand sich auf der erwarteten Höhe von 77 kDa (Pfeil). C. Die Expressionskontrolle für *PflCCp4rp5*-pGex lieferte auch nach mehrmaliger Wiederholung ein negatives Ergebnis: es erfolgte keine Überexpression des *PflCCp4rp5*-GST-Fusionsproteins (58 kDa). +, IPTG-induziert; -, keine Induktion.³⁶

Die Expressionskontrolle für das *PflCCp4rp3*-pGex-Konstrukt zeigte eine starke Überexpression von *PflCCp4rp3*-GST in BL21-(DE3)-RIL-Zellen. Die Migrationshöhe der Proteinbande entsprach dem errechneten Molekulargewicht von 53 kDa (Abb. 3.4A). Die Expression des 77-kDa-großen GST-Fusionsproteins *PflCCp4rp4* fiel dagegen nur sehr schwach aus (Abb. 3.4B). Für das *PflCCp4rp5*-pGex-Konstrukt konnte trotz mehrmaliger

Wiederholung keine Expression festgestellt werden (Abb. 3.4C). Die entsprechende Proteinbande hätte eine Größe von 58 kDa besessen.

3.1.1.2 Aufreinigung rekombinanter PfCCp4-Proteine

Wie Abb. 3.5 zeigt, lieferte die Maxi-Expression und Aufreinigung der verschiedenen rekombinanten PfCCp4-Proteine als *Inclusion Bodies* (siehe Kapitel 2.2.3.2) ausreichend Material zur Immunisierung von Mäusen (siehe Kapitel 2.2.3.7).

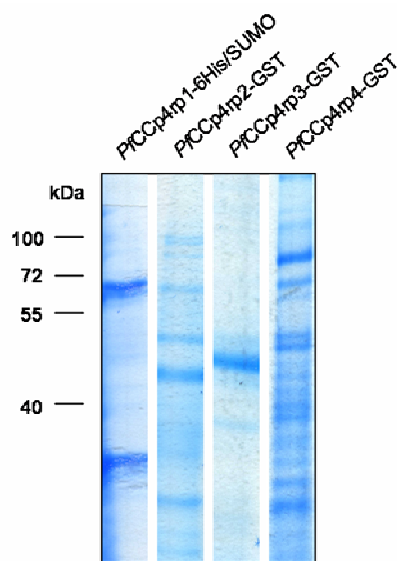


Abb. 3.5. Proteinausbeute nach *Inclusion-Body*-Aufreinigung der rekombinanten PfCCp4-Proteine. Die Ausbeute betrug etwa 20 µg/µl für PfCCp4rp1-6His/SUMO und jeweils 0,5 µg/µl für PfCCp4rp2-GST, PfCCp4rp3-GST und PfCCp4rp4-GST.³⁷

3.1.1.3 Negativkontrollen - GST- und 6His/SUMO-Peptid

Als Negativkontrolle für spätere Experimente dienten stets das GST- und das 6His/SUMO-Peptid alleine bzw. Antiseren gegen diese Fusionsproteinkomponenten. Hierfür wurden die ursprünglichen Vektoren pGex-4T-1 bzw. pSUMO/pSMT3 in BL21-(DE3)-RIL-Zellen transformiert und die Expression des jeweiligen Peptids durch IPTG induziert. Die Aufreinigung erfolgte als *Inclusion Bodies* nach Maxi-Expression. Die Ausbeute ist in Abb. 3.6 dargestellt und betrug sowohl für das GST- als auch für den 6His/SUMO-Fusionspeptid etwa 2 µg/µl.

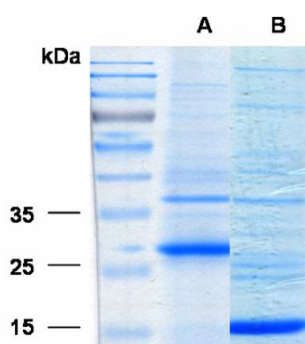


Abb. 3.6. Proteinausbeute der Fusionspeptide nach *Inclusion-Body*-Aufreinigung. A. GST-Peptid (26 kDa). B. 6His/SUMO-Peptid (13 kDa).³⁸

3.1.1.4 Test der Immunsereen an rekombinanten Proteinen

Nach Proteinaufreinigung wurden *Inclusion Bodies* von *PfCCp4rp1*-6His/SUMO, *PfCCp4rp2*-GST, *PfCCp4rp3*-GST, *PfCCp4rp4*-GST, von dem GST- und dem 6His/SUMO-Fusionspeptid zur Immunisierung von jeweils drei Mäusen verwendet (siehe Kapitel 2.2.3.7). Nach Isolation der Antisereen erfolgte deren Testung zunächst durch Western-Blot-Studien an 0,5 µg des entsprechenden rekombinanten Proteins. Dabei zeigten Antisereen gegen *PfCCp4rp1* (58 kDa), *PfCCp4rp3* (53 kDa), gegen das 6His/SUMO- (13 kDa) sowie das GST-Peptid (26 kDa) spezifische Reaktionen. Proteinbanden, die sich für *PfCCp4rp2* und *PfCCp4rp4* ergaben, entsprachen nicht dem erwarteten Molekulargewicht von 52 kDa bzw. 77 kDa (Abb. 3.7).

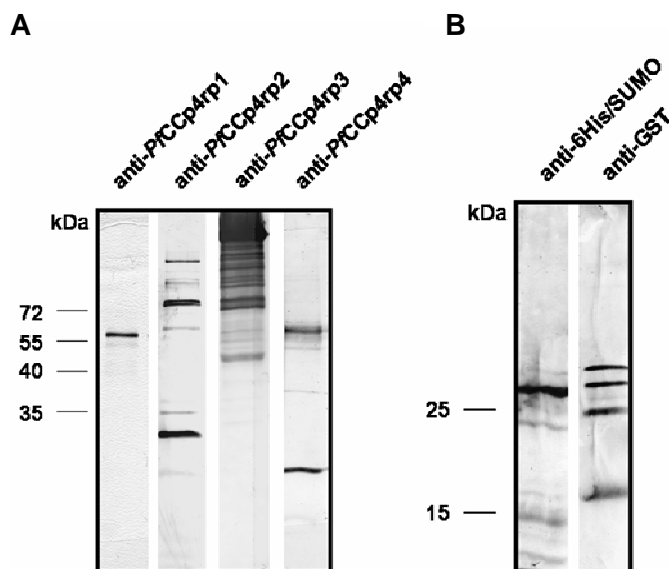


Abb. 3.7. Western-Blot-Analysen polyklonaler Mausereen an ihren rekombinanten Proteinen. A. Polyklonale Mausereen gegen *PfCCp4rp1* sowie *PfCCp4rp3* detektierten Proteinbanden des erwarteten Molekulargewichts (58 kDa bzw. 53 kDa). B. Polyklonale Mausereen gegen das 6His/SUMO-Peptid und das GST-Peptid erkennen neben unspezifischen Bindungen ihr zugehöriges rekombinantes Protein (13 kDa bzw. 26 kDa).³⁹

3.1.2 Expressionsanalyse von *PfCCp4*

3.1.2.1 Charakterisierung von *PfCCp4* auf RNA-Ebene

Das vierte Mitglied der *PfCCp*-Familie, *PfCCp4*, umfasst 4805 bp und ist auf Chromosom Nummer neun lokalisiert. Es kodiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa, das über zwei LCCL- und zwei Levanase-Domänen sowie eine N-terminale Signalsequenz verfügt. Membranverankerungssequenzen oder ein GPI-Anker konnten bei *in-silico*-Untersuchungen nicht identifiziert werden (Pradel *et al.*, 2004).

Die *PfCCp4*-Expressionsanalyse erfolgte zunächst auf Transkriptebene. Hierzu wurde, wie in Kapitel 2.2.2.10 beschrieben, RNA aus asexuellen Parasiten, aufgereinigten Gametozyten,

Gameten sowie Zygoten isoliert und in die Transkriptanalyse eingesetzt. Die diagnostische RT-PCR (siehe Kapitel 2.2.2.2) zeigte nach 25 und 30 Zyklen eine spezifische Expression von *PfCCp4* in Gametozyten und Gameten, während eine Expression in asexuellen Stadien oder Zygoten nicht detektierbar war (Abb. 3.8).

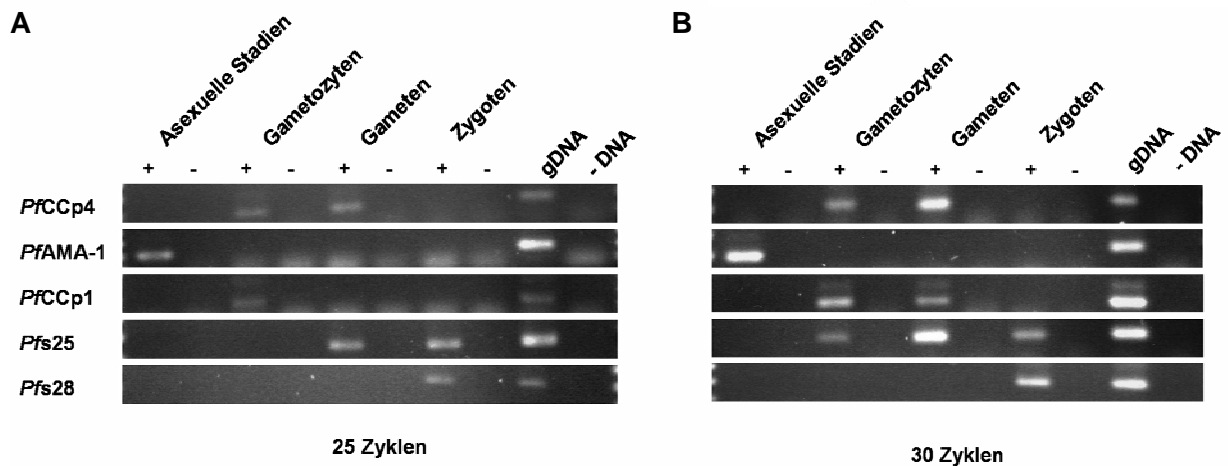


Abb. 3.8. Sexualstadienspezifische Transkriptexpression von *PfCCp4*. Semi-quantitative RT-PCR-Analysen nach 25 (A) und 30 Zyklen (B) zeigten eine sexualstadienspezifische Expression der *PfCCp4*-mRNA in Accudenz™-aufgereinigten Gametozyten und Gameten. In asexuellen Stadien sowie Zygoten war keine Expression detektierbar. Kontrollen: *PfAMA-1*, asexuelle Stadien; *PfCCp1*, Gametozyten; *Pfs25*, Gameten und Zygoten, *Pfs28*, Zygoten; Positivkontrolle, gDNA; Negativkontrolle, ohne DNA (- DNA); +/- RT, Ansatz mit bzw. ohne reverse Transkriptase.⁴⁰

Als Kontrollen dienten Oligonukleotidpaare gegen *PfAMA-1*, das in asexuellen Stadien exprimiert wird (Peterson *et al.*, 1989; Narum und Thomas, 1994; Hodder *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1996), gegen *PfCCp1* (Expression in Gametozyten und Makrogameten; Pradel *et al.*, 2004, 2006; Scholz *et al.*, 2007), gegen *Pfs25* (Expression in Makrogameten, Zygoten und Ookineten, mit geringem Expressionsniveau in Gametozyten; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990) sowie gegen *Pfs28*, das in Zygoten und Ookineten exprimiert wird (Duffy und Kaslow, 1997). In die Positivkontrolle wurde genomische DNA (gDNA) eingesetzt, die Negativkontrolle (- DNA) enthielt keine DNA. Nach nur 20 Zyklen war generell kein Signal erkennbar.

3.1.2.2 Western-Blot-Analysen zur *PfCCp4*-Expression an Wildtyplysaten

Es folgten Western-Blot-Analysen der produzierten Antiseren und polyklonalen Peptidantikörper anti-*PfCCp4pt1* aus Kaninchen bzw. *PfCCp4pt2* aus Maus (siehe Kapitel 2.2.3.7) an Lysaten von asexuellen WT-Parasiten sowie *Accudenz*[™]-aufgereinigten Gametozyten. Ein Signal konnte ausschließlich für das Antiserum gegen *PfCCp4rp3* festgestellt werden. Dieses bestätigte eine sexualstadienspezifische Expression von *PfCCp4* wie sie bereits in den oben beschriebenen RT-PCR-Studien (siehe Kapitel 3.1.2.1) beobachtet werden konnte. Neben der erwarteten *PfCCp4*-Bande von 180 kDa wurde in Gametozytenlysat eine zusätzliche Proteinbande von 60 kDa detektiert (Abb. 3.9). Expressionsstudien an *PfCCp4*-KO-Parasiten zeigten später, dass es sich dabei nicht um ein Prozessierungsprodukt, sondern um eine unspezifische Kreuzreaktion handelt (siehe Kapitel 3.1.4.1).

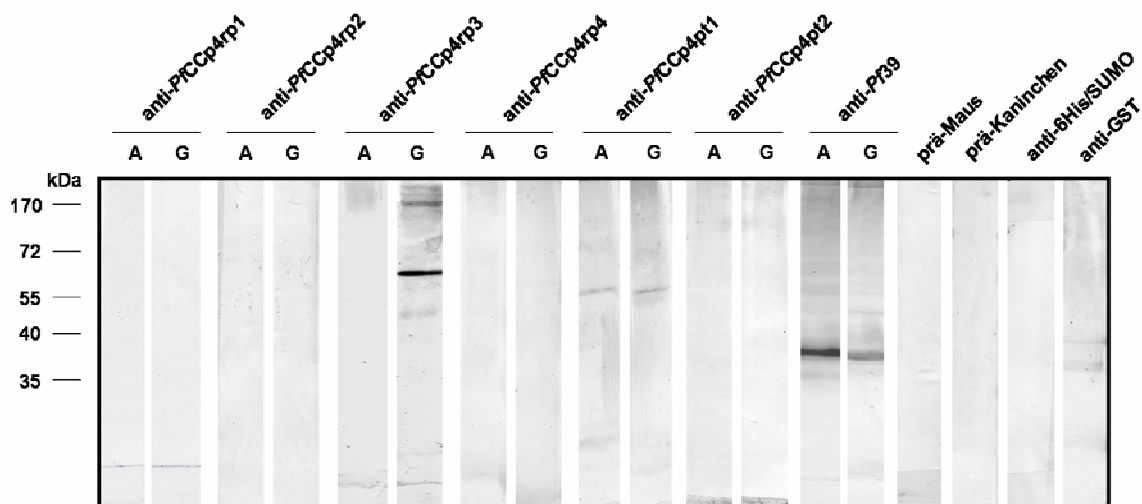


Abb. 3.9. Western-Blot-Analysen der produzierten *PfCCp4*-Antiseren an WT-Lysat asexueller Parasiten (A) und aufgereinigter Gametozyten (G). Das polyklonale Mausserum gegen *PfCCp4rp3* detektierte *PfCCp4* (180 kDa) in Gametozytenlysat, jedoch nicht im Lysat von asexuellen Parasiten. Eine zusätzliche Proteinbande auf 60 kDa ist auf eine unspezifische Kreuzreaktion zurück zu führen. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung aller Gelspuren diente polyklonales Mausserum gegen das ER-assoziierte Protein *Pf39*. Negativkontrollen an Gametozytenlysat: neutrales Mausserum (prä-Maus), neutrales Kaninchenserum (prä-Kaninchen), polyklonale Mausseren gegen das 6His/SUMO- bzw. GST-Peptid. Mausseren: anti-*PfCCp4rp1*-6His/SUMO, anti-*PfCCp4rp2*-GST, anti-*PfCCp4rp3*-GST, anti-*PfCCp4pt2*; Kaninchenserum: anti-*PfCCp4pt1*.⁴¹

Um eine gleichmäßige Proteinbeladung der verschiedenen Gelspuren zu überprüfen, wurde polyklonales Mausserum gegen *Pf39* verwendet. Bei *Pf39* handelt es sich um ein Protein, das assoziiert mit dem ER sowohl in asexuellen Parasiten als auch in Gametozyten

exprimiert wird (Templeton *et al.*, 1997). Als Negativkontrollen dienten neutrale Maus- oder Kaninchenserum sowie Antiseren gegen das GST- und 6His/SUMO-Peptid.

3.1.2.3 Immunfluoreszenzstudien

Detaillierte Expressionsstudien auf Proteinebene wurden anhand indirekter Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1.10). Dabei kamen sowohl polyklonale Mausseren gegen *PfCCp4rp1* und *PfCCp4pt2* als auch polyklonale Kaninchenserum gegen *PfCCp4pt1* zum Einsatz. Es zeigte sich, dass *PfCCp4* während der Gametozytogenese in allen fünf Gametozytenstadien homogen an der Parasitenoberfläche exprimiert wird (Abb. 3.10). Dies steht im Gegensatz zu *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*, die in Gametozyten zwar ebenfalls eine Oberflächen-assoziierte Expression, jedoch in einem punktierten Muster aufweisen (siehe Kapitel 1.4.2). Ebenso ließ sich für *PfCCp4* keine Freisetzung nach Aktivierung der Gametozyten beobachten, wie es für *PfCCp1* bis *PfCCp3* zutrifft. Stattdessen konnte *PfCCp4* auch auf Makrogameten homogen an der parasitären Oberfläche detektiert werden (Abb. 3.10).

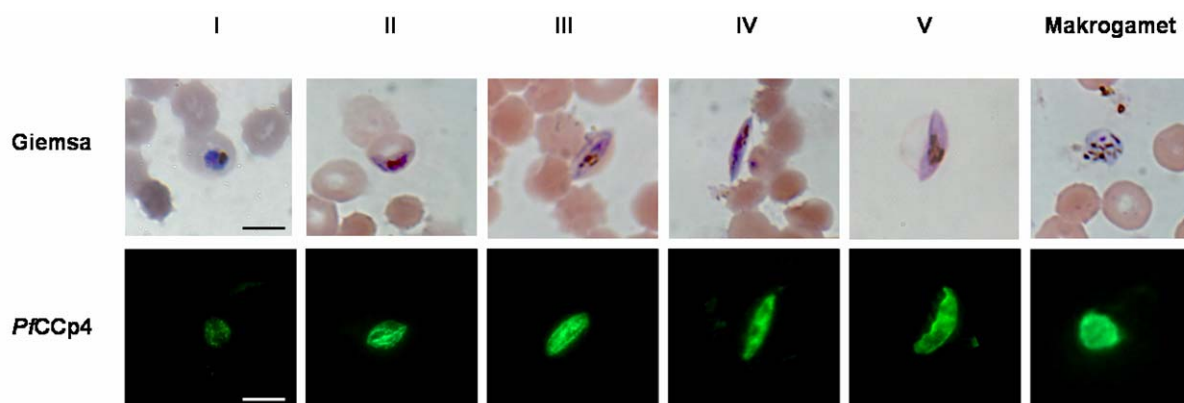


Abb. 3.10. Detaillierte Expressionsanalyse von *PfCCp4* auf Proteinebene. Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung polyklonaler Maus- bzw. Kaninchenserum gegen *PfCCp4* und Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpern (in Grün) zeigten eine homogene, Oberflächen-assoziierte Expression von *PfCCp4* in Gametozyten der Stadien I bis V sowie in Makrogameten (untere Reihe). Giemsa-gefärbte Blutaussstriche verdeutlichen die morphologischen Unterschiede während der Gametozytogenese bis zur Bildung von Gameten (obere Reihe). Größenangabe, 5 μm .⁴²

Da sich Gametozyten des Stadium I morphologisch nicht von reifen Trophozoiten unterscheiden lassen, wurde diese stadienspezifische Expression durch Ko-Markierungsstudien mit polyklonalem Rattenserum gegen *PfPeg3* verifiziert. Bei *PfPeg3* handelt es sich

um ein Protein, das bereits in frühen Gametozyten exprimiert wird (Silvestrini *et al.*, 2005; Lanfracotti *et al.*, 2007; Abb. 3.11).

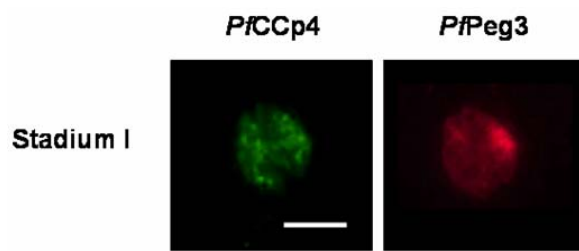


Abb. 3.11. *PfCCp4*-Expression in jungen Gametozyten. Ko-Markierungs-Studien von *PfCCp4* (in Grün) und *PfPeg3* (in Rot) zeigten, dass die Expression von *PfCCp4* in Gametozyten des Stadium I beginnt. Größenangabe, 8 µm.⁴³

Zusätzliche Ko-Markierungs-Studien von *PfCCp4* mit *PfMSP-1*, *Pfs25* und *Pfalpa-Tubulin-II* gaben weiteren Aufschluss über die stadienspezifische Expression. Dabei wurde Antiserum gegen *PfMSP-1* verwendet, um asexuelle Stadien zu markieren, während Antiserum gegen *Pfs25* dazu diente, Gametozyten, Makrogameten, Zygoten und Ookineten zu identifizieren (ATCC, Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990). Antiserum gegen *Pfalpa-Tubulin-II* ließen Mikrogameten erkennen (Rawlings *et al.*, 1992). Bei Negativkontrollen mit neutralem Mausserum, neutralem Kaninchenserum und Mausserum gegen das 6His/SUMO-Peptid konnte erwartungsgemäß keine Markierung detektiert werden.

Immunfluoreszenzstudien zur Untersuchung von *PfCCp4* in asexuellen Parasitenstadien zeigten weder eine *PfCCp4*-Expression in frühen oder späten Trophozoiten, noch in Schizonten. Sie bestätigten somit die durch RT-PCR und Western Blot gewonnenen Ergebnisse einer sexualstadienspezifischen Expression von *PfCCp4* (Abb. 3.12).

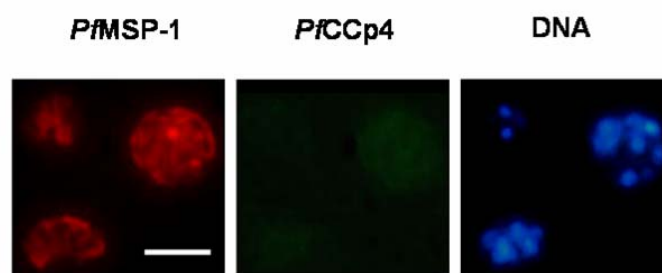


Abb. 3.12. *PfCCp4*-Expression in asexuellen Parasitenstadien. In Ko-Markierungs-Studien mit *PfMSP-1* (in Rot) ließ sich keine *PfCCp4*-Expression in Trophozoiten oder Schizonten detektieren. Kernmaterialfärbung mit *Hoechst Nuclear Stain* (in Blau); Größenangabe, 8 µm.⁴⁴

Trotz deutlicher Expression in Makrogameten ließ sich keine Expression von *PfCCp4* in Mikrogameten feststellen (Abb. 3.13). Diese Geschlechtsspezifität bildet sich erst während der Gametogenese aus, da in Gametozyten eine Ko-Markierung von *PfCCp4* sowohl mit

Pfs25-positiven, weiblichen Zellen, als auch partiell mit *Pf*alpha-Tubulin-II-positiven, männlichen Zellen zu beobachten war. Ebenso konnte in einigen, jedoch nicht allen *Pf*CCp4-positiven Gametozyten eine Ko-Expression mit *Pf*MR5, einem Protein männlicher Gametozyten (Eksi und Williamson, 2002) detektiert werden (Abb. 3.14).



Abb. 3.13. Geschlechtsspezifische Expression von *Pf*CCp4 in Gameten. Ko-Markierungs-Studien von *Pf*CCp4 und *Pf*alpha-Tubulin-II, einem Protein männlicher Gametozyten und Gameten (in Rot), ließen keine *Pf*CCp4-Expression in Mikrogameten erkennen. Kernmaterialfärbung des für Mikrogameten typisch länglichen Zellkerns erfolgte mit *Hoechst Nuclear Stain* (in Blau); Σ , Überlagerung der Einzelbilder; Größenangabe, 8 μm .⁴⁵

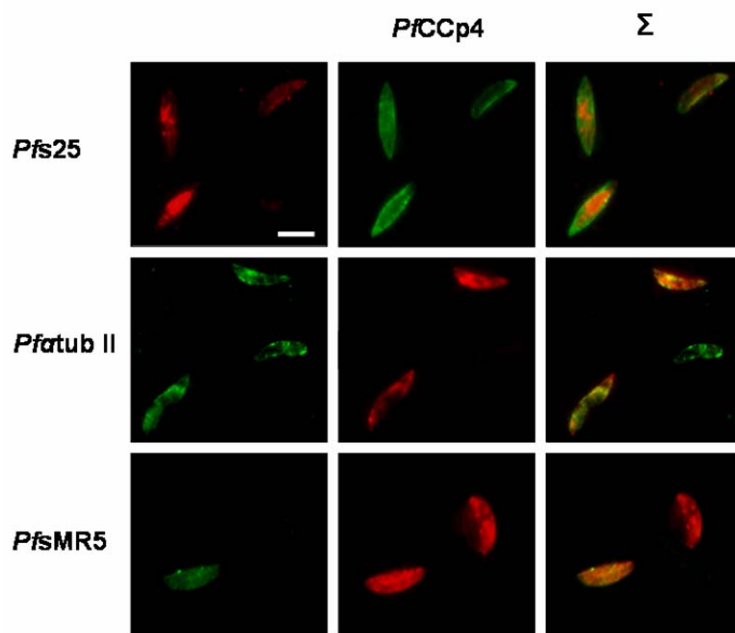


Abb. 3.14. *Pf*CCp4-Expression in Makro- und Mikrogametozyten. Immunfluoreszenzstudien zur Ko-Expression von *Pf*CCp4 und den geschlechtsspezifischen Proteinen *Pfs25* (weibliche Gametozyten) bzw. *Pf*alpha-Tubulin-II und *Pf*MR5 (männliche Gametozyten) zeigten keine eindeutige geschlechtsspezifische *Pf*CCp4-Expression in Gametozyten. Σ , Überlagerung der Einzelbilder; Ko-Expression in Gelb; Größenangabe, 6 μm .⁴⁶

Während *Pf*CCp4 in Zygoten kaum exprimiert wird, konnte im Zuge der Ookinetenreifung eine erneute Zunahme homogener *Pf*CCp4-Expression verzeichnet werden (Abb. 3.15). Verwechslung der tetraploiden Ookineten mit morphologisch ähnlichen, jedoch nur haploiden Gametozyten wurde durch Anfärben des Kernmaterials mit *Hoechst Nuclear Stain* ausgeschlossen.

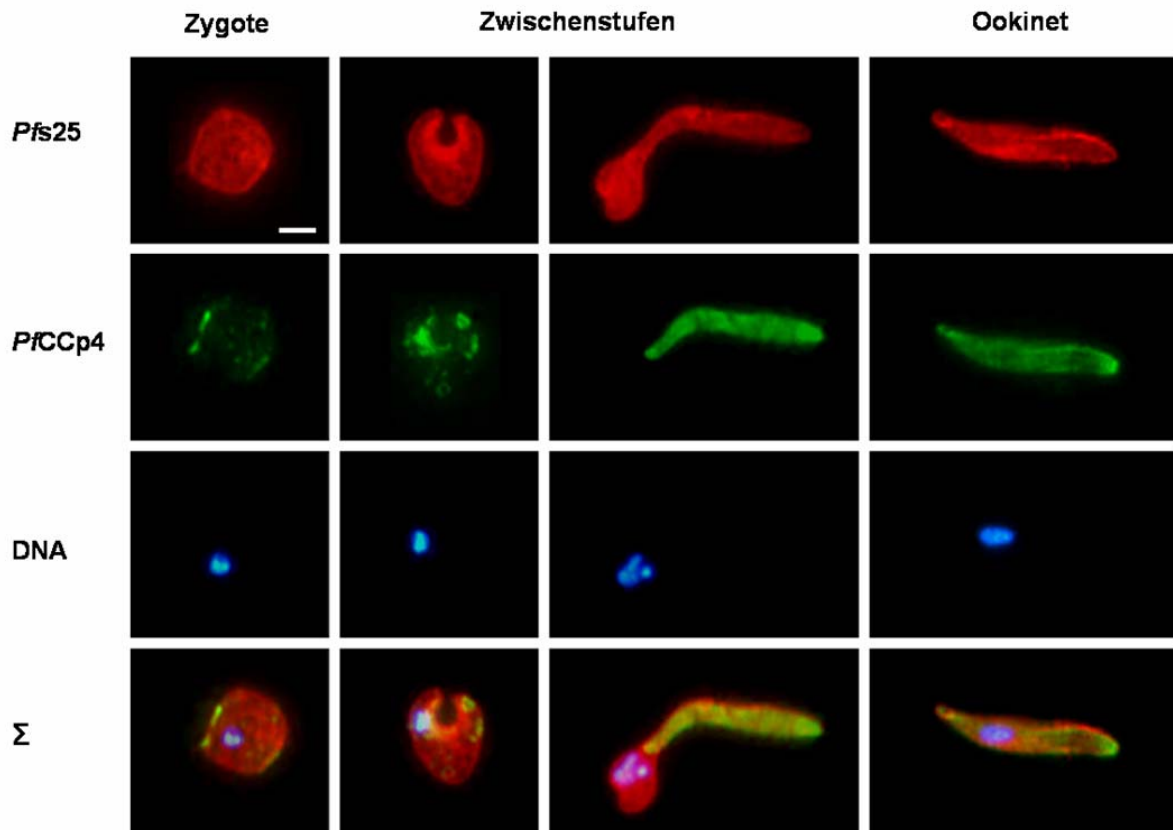


Abb. 3.15. Wiederaufnahme der *PfCCp4*-Expression während der Ookinetenreifung. In Immunfluoreszenzstudien an Mückenmitteldärmen konnte durch Ko-Markierung von *PfCCp4* (in Grün) und *Pfs25* (in Rot) im Laufe der Ookinetenreifung eine erneut zunehmende, homogene *PfCCp4*-Expression detektiert werden. Blau, Kernmaterial gefärbt mit *Hoechst Nuclear Stain*; Σ , Überlagerung der Einzelbilder; Ko-Expression in Gelb; Größenangabe, 4 μm .⁴⁷

Im Zuge dieser Immunfluoreszenzstudien konnte außerdem gezeigt werden, dass *Pfs25* nicht nur - wie bisher in der Literatur beschrieben - in Gameten, Zygoten und Ookineten, sondern bereits in Gametozyten exprimiert wird. Dies gilt sowohl für unaktivierte, als auch für aktivierte Gametozyten der Stadien IV und V. Während die Expression in unaktivierten Gametozyten ausschließlich intrazellulär und vesikulär erschien, konnte in reifen, aktivierten Gametozyten sowohl eine vesikuläre Expression als auch eine beginnende Oberflächenassoziation von *Pfs25* detektiert werden (Abb. 3.16).

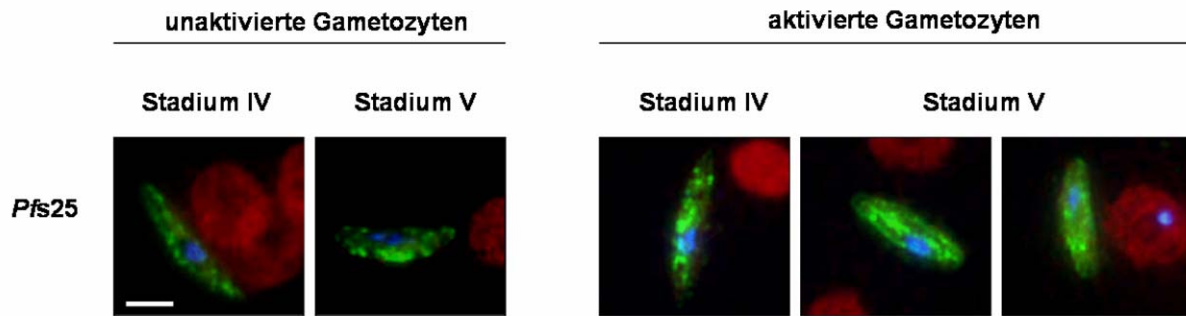


Abb. 3.16. *Pfs25*-Expression in Gametozyten. Immunfluoreszenzstudien mit polyklonalem Kaninchenserum gegen *Pfs25* und Alexa-488-gekoppeltem Sekundärantikörper (in Grün) zeigten in unaktivierten Gametozyten eine zytoplasmatische, vesikuläre *Pfs25*-Expression. Dagegen war in reifen, aktivierten Gametozyten zusätzlich eine beginnende Oberflächenassoziation zu beobachten. Rot, Erythrozyten gegengefärbt mit *Evans Blue*; Blau, Kernmaterial angefärbt mit *Hoechst Nuclear Stain*; Größenangabe, 4 µm.⁴⁸

3.1.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Aufnahmen von Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung eines konfokalen *Laser-scanning*-Mikroskops hatten auf eine Oberflächenassoziation von *PfCCp4* innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten schließen lassen (Abb. 3.17). Zur Bestätigung dieses Sachverhalts folgten detailliertere Analysen der *PfCCp4*-Lokalisation am Transmissionselektronenmikroskop. Dazu wurde *PfCCp4* in reifen Gametozyten unter Verwendung von ALP bzw. 12-nm-Goldpartikeln immunmarkiert (siehe Kapitel 2.2.1.11).

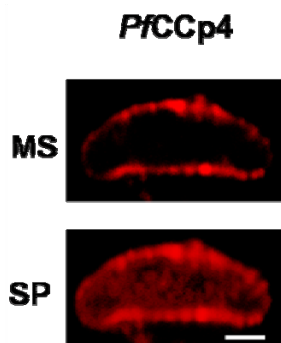


Abb. 3.17. Expression von *PfCCp4* innerhalb der parasitophoren Vakuole. Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie ließ auf eine *PfCCp4*-Lokalisierung (in Rot) innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten in Assoziation mit der parasitären Plasmamembran schließen. MS, medialer Schnitt; SP, Stapelprojektion. Größenangabe, 2 µm.⁴⁹

Aufgrund der präparativen Schwierigkeiten Goldpartikel in Gametozyten einzuschleusen, lieferte nur der ALP-Ansatz auswertbare Resultate. Hier bestätigten jedoch Präzipitate des ALP-Substrats am Lokalisationspunkt von *PfCCp4* eine Oberflächen-assoziierte Expression innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten (Abb. 3.18).

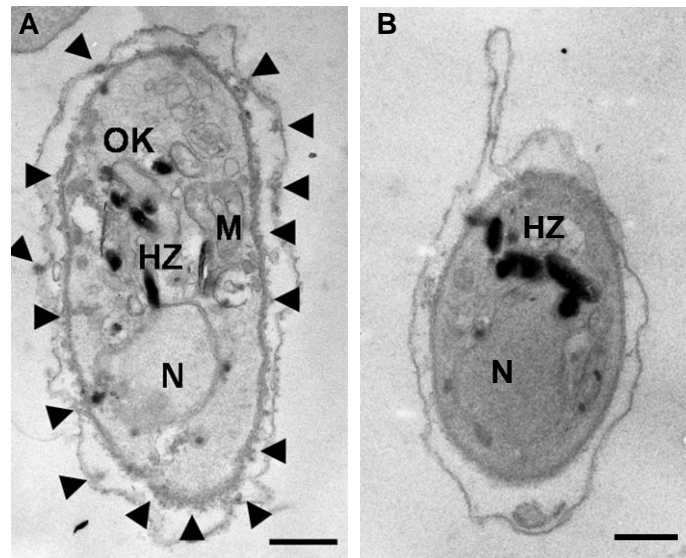


Abb. 3.18. Ultrastrukturelle Lokalisation von *PfCCp4* in reifen Gametozyten. A. Immunelektronenmikroskopische Studien bestätigten durch Präzipitate des ALP-Substrats am Antigen (Pfeile) die Oberflächen-assoziierte Lokalisation von *PfCCp4* innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten. B. Negativkontrolle. Immunmarkierung mit neutralem Mausserum. HZ, Hämозоин; M, Mitochondrium; N, Nukleus, OK, osmiophile Körperchen. Größenangabe, 1 μm .⁵⁰

3.1.3 Verifizierung von *PfCCp4*-knockout-Parasiten

Parallel zu den Expressionsstudien sollten Funktionsanalysen an *PfCCp4*-KO-Parasiten durchgeführt werden. Vorarbeiten hierfür beinhalteten die Verifizierung der Genspaltung in bereits vorhandenen *PfCCp4*-KO-Klonen durch diagnostische PCR und Southern-Blot-Restriktionsanalysen. Die *PfCCp4*-KO-Klone waren zuvor am WMC in New York in zwei unabhängigen Ansätzen durch die Integration des Konstrukts *pPfCCp4*-KO mittels homologer Rekombination in den WT-Lokus hergestellt worden (siehe Kapitel 2.2.1.9).

3.1.3.1 Diagnostische PCR

Diese spezielle PCR zur Verifizierung der *PfCCp4*-Genspaltung wurde anhand von zwei Oligonukleotidpaaren durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1.9). Dabei war ein 1145-bp-großes PCR-Produkt diagnostisch für den WT-Genlocus, während eine Produktgröße von 1063 bp die *PfCCp4*-Genzerstörung bestätigte. Untersucht wurde gDNA von fünf *PfCCp4*-KO-Klonen: K4H, L4C, M1H, O12B und P3D. Für jeden dieser Klone konnte im Vergleich zum WT die Integration des KO-Konstrukts und somit eine erfolgreiche *PfCCp4*-Genspaltung durch PCR und anschließende Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Abb. 3.19).

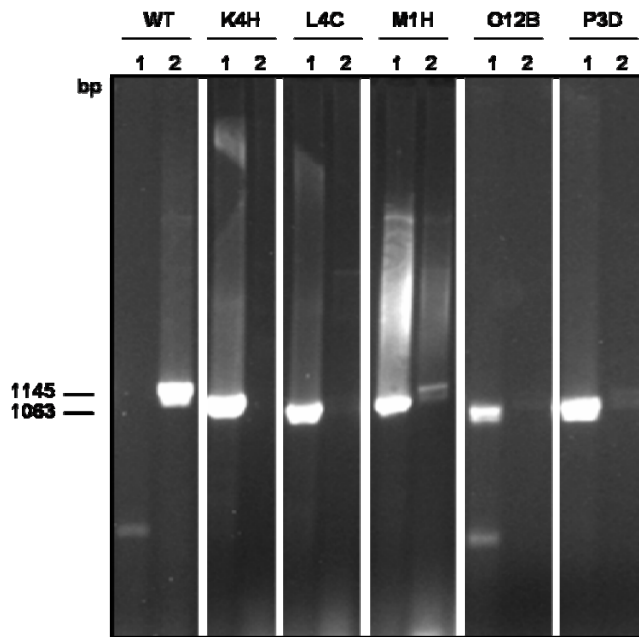


Abb. 3.19. Diagnostische PCR an gDNA von WT-Parasiten und den fünf *PfCCp4*-KO-Klonen K4H, L4C, M1H, O12B und P3D. Ein 1063-bp-großes PCR-Produkt in Spur 1 bestätigte die Integration des KO-Konstrukts in den *PfCCp4*-WT-Lokus. Spur 2 zeigte durch ein 1145-bp-großes PCR-Produkt die Präsenz des *PfCCp4*-WT-Lokus. Alle fünf Klone wiesen Integration des KO-Vektors auf.⁵¹

3.1.3.2 Southern-Blot-Restriktionsanalyse

Neben der diagnostischen PCR dienen Southern-Blot-Restriktionsanalysen dazu, die Integration des Konstrukts *pPfCCp4-KO* in den *PfCCp4*-WT-Lokus zu verifizieren und die korrekte Genspaltung in einen pseudo-diploiden *PfCCp4*-KO-Genlocus nachzuweisen (siehe Kapitel 2.2.2.12). Dies konnte für alle drei der untersuchten *PfCCp4*-KO-Klone L4C, O12B sowie P3D bestätigt werden (Abb. 3.20).

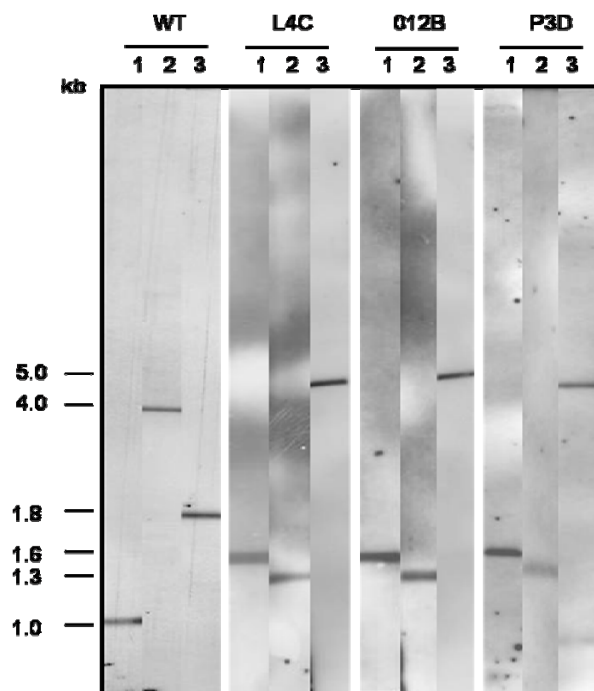


Abb. 3.20. Southern-Blot-Analyse. Der Restriktionsverdau von WT- und *PfCCp4*-KO-gDNA verifizierte die korrekte *PfCCp4*-Genspaltung durch Integration des KO-Konstrukts für die drei Klone L4C, O12B und P3D. Spalte 1 entspricht jeweils dem Restriktionsverdau durch *HindIII* (WT, 1 kb; KO, 1,6 kb), Spur 2 jenem durch *AfeI* und *XbaI* (WT, 4 kb; KO, 1,3 kb) und Spur 3 dem Verdau durch *AfeI* und *AclI* (WT, 1,8 kb; KO, 5 kb).⁵²

3.1.4 Phänotypenanalysen von *PfCCp4*-knockout-Parasiten

3.1.4.1 Parasitenentwicklung *in vitro*

Nach Bestätigung des *PfCCp4*-KO auf genomischer Ebene wurde zunächst die Abschaltung der *PfCCp4*-Expression auf RNA- und Proteinebene überprüft. RT-PCR-Studien zeigten jedoch, dass in allen drei Klonen trotz Genspaltung weiterhin ein *PfCCp4*-Transkript in *PfCCp4*-KO-Gametozyten präsent war (Abb. 3.21). Diese Hintergrundexpression könnte auf eine geringe Promotoraktivität des integrierten *PfCCp4*-KO-Vektors zurückzuführen sein. Als Kontrolle für Gametozyten dienten in der RT-PCR-Analyse Oligonukleotide gegen *Pfs25*. Die Positivkontrolle enthielt gDNA, die Negativkontrolle wurde ohne DNA durchgeführt. Auf Proteinebene konnte dagegen das Fehlen von *PfCCp4* durch Western Blot und Immunfluoreszenzstudien nachgewiesen werden (Abb. 3.22).

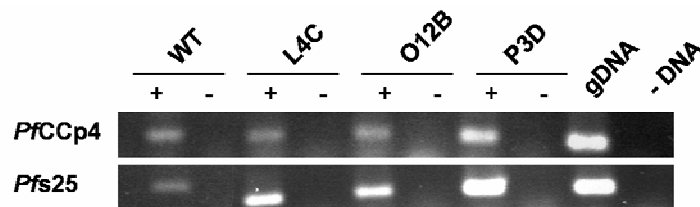


Abb. 3.21. *PfCCp4*-Transkriptexpression in *PfCCp4*-KO-Parasiten. RT-PCR-Analysen an *PfCCp4*-KO-Gametozyten zeigten eine Restexpression des *PfCCp4*-Transkripts in den *PfCCp4*-KO-Klonen L4C, O12B und P3D nach 30 Zyklen. Kontrollen: *Pfs25*, Gametozyten; gDNA, Positivkontrolle; - DNA, Negativkontrolle ohne DNA; WT, Wildtyp-cDNA; +/- RT, Ansatz mit bzw. ohne reverse Transkriptase.⁵³

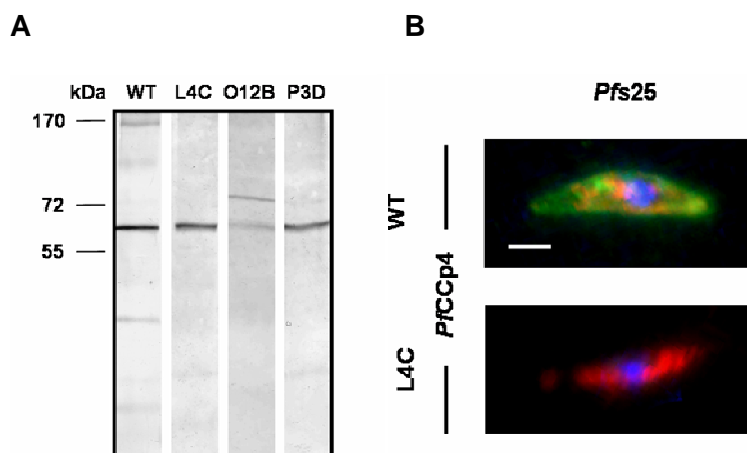


Abb. 3.22. Unterdrückung der *PfCCp4*-Expression in *PfCCp4*-KO-Parasiten. A. Western-Blot-Studien an WT-Gametozytenlysate und Lysate von Gametozyten der *PfCCp4*-KO-Klone L4C, O12B sowie P3D bestätigten das Fehlen der *PfCCp4*-Expression (180 kDa) in den entsprechenden KO-Linien.

Eine zusätzliche Proteinbande auf 60 kDa ist auf eine unspezifische Kreuzreaktion zurück zu führen. B. Ko-Markierungs-Studien verifizierten das Fehlen von *PfCCp4* in Gametozyten des *PfCCp4*-KO-Klons L4C im Vergleich zum WT. *PfCCp4*, in Grün; *Pfs25*, in Rot; Kernmaterial, durch Markierung mit *Hoechst Nuclear Stain* in Blau; Größenangabe, 2 μ m.⁵⁴

3.1.4.2 Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken

Da die verifizierten *PfCCp4*-KO-Klone *in vitro* bis zum Zygotenstadium eine im Vergleich zum WT normale Parasitenentwicklung erkennen ließen, wurden weitere Phänotypenanalysen mittels Membranfütterungen durchgeführt. Dazu wurden *Anopheles stephensi*-Mücken mit reifen Gametozytenkulturen von WT oder *PfCCp4*-KO-Klonen gefüttert (siehe Kapitel 2.2.1.5). Nach zehn bis zwölf Tagen wurden Mitteldärme isoliert und auf Oozystenbildung untersucht, nach 18 bis 22 Tagen erfolgte die Speicheldrüsenpräparation zur Sporozoitenanalyse. Dabei konnte in zwei unabhängigen Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken gezeigt werden, dass genauso viele Mücken von *PfCCp4*-KO-Klonen infiziert wurden wie von WT-Parasiten. Die Anzahl der Oozysten war ebenfalls vergleichbar (Tab. 3.2, Fütterung 1 und 2). In fünf unabhängigen Fütterungen zeigte sich außerdem, dass die Infektionsrate der Speicheldrüsen durch *PfCCp4*-KO-Klone deutlich variierte (Tab. 3.2; Fütterung 1 bis 5). Mehrheitlich war jedoch eine Infektion der Speicheldrüsen durch *PfCCp4*-KO-Sporozoiten zu beobachten, die mit dem WT vergleichbar war. Nur selten wurde die Transmission der *PfCCp4*-KO-Parasiten in die Speicheldrüsen vollständig blockiert. Insgesamt konnte daraus gefolgert werden, dass *PfCCp4* - im Gegensatz zu *PfCCp2* und *PfCCp3* - keine essentielle Rolle im Lebenszyklus von *P. falciparum* innerhalb des Mückenvektors zu spielen scheint.

Tab. 3.2. Membranfütterungen von *Anopheles stephensi* an WT- und *PfCCp4*-KO-Gametozyten (Scholz *et al.*, 2007).

		Mitteldärme		Speicheldrüsen	
		infiziert/präpariert		infiziert/präpariert	
Fütterung 1	WT	17/20	85 %	13/15	87 %
	<i>PfCCp4</i> -KO Klon P3D	7/20	35 %	0/10	0 %
Fütterung 2	WT	6/20	30 %	1/11	9 %
	<i>PfCCp4</i> -KO Klon P3D	6/20	30 %	5/6	83 %
	<i>PfCCp4</i> -KO Klon L4C	2/20	10 %	0/9	0 %
	<i>PfCCp4</i> -KO Klon M1H	6/20	30 %	1/10	10 %
Fütterung 3	<i>PfCCp4</i> -KO Klon P3D	7/20	35 %	2/13	15 %
	<i>PfCCp4</i> -KO Klon L4C	8/20	40 %	0/16	0 %
Fütterung 4	<i>PfCCp4</i> -KO Klon O12B	6/20	30 %	2/20	10 %
	<i>PfCCp4</i> -KO Klon P3D	6/20	30 %	4/10	40 %
	<i>PfCCp4</i> -KO Klon L4C	4/20	20 %	1/20	5 %
Fütterung 5	<i>PfCCp4</i> -KO Klon K4H	8/12	67 %	4/10	40 %

3.2 Funktionsanalyse der *PfCCp*-Proteine durch Interaktionsstudien

3.2.1 Ko-abhängige Expression

Wie bereits 2006 in Pradel *et al.* veröffentlicht wurde, exprimieren die *PfCCp3*-KO-Klone H3D und I9C trotz unveränderten Transkriptlevels weder *PfCCp1* noch *PfCCp2*, während die Proteinexpression von *PfCCp1* und *PfCCp3* in den beiden *PfCCp2*-KO-Klonen D11H und F1D reduziert erscheint. Diese ko-abhängige Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* sowie ihre partielle Freisetzung und matrixähnliche Anordnung um Exflagellationszentren gaben den Anstoß, über Interaktionsstudien mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen darzustellen.

Aktuelle Studien zur ko-abhängigen Expression unter Einbeziehung des kürzlich generierten *PfCCp1*-KO-Klons 5YE2 (Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. J. Templeton) sind in Abb. 3.23 dargestellt. Durch Western-Blot-Analysen an Gametozytenlysate von *PfCCp1*-, *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Klonen konnte unter Verwendung teils neu generierter Antikörper gegen *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* eine ko-abhängige Expression dieser Proteine beobachtet werden. In allen drei *PfCCp*-KO-Linien war neben dem Fehlen des ausgeschalteten Proteins ebenso ein Mangel der beiden anderen *PfCCp*-Proteine festzustellen.

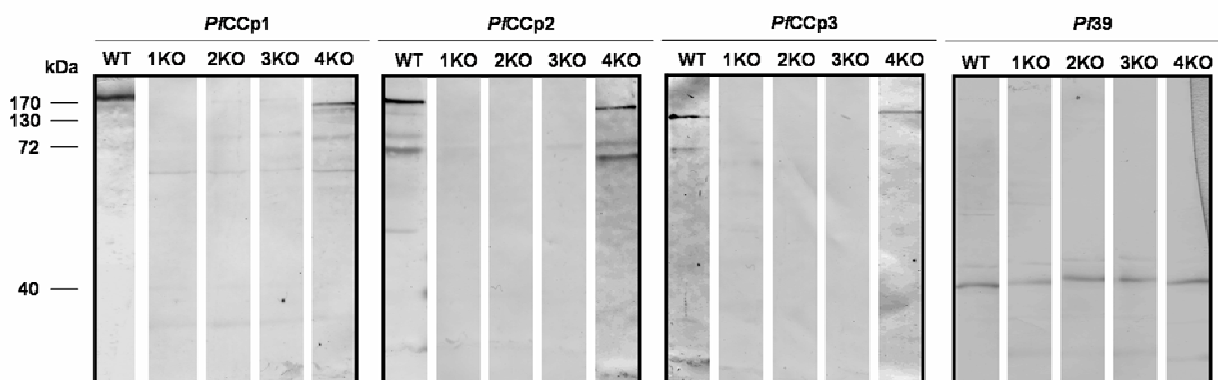


Abb. 3.23. Western-Blot-Analysen zur ko-abhängigen *PfCCp*-Expression. Neu generierte Antikörper gegen *PfCCp1* (α -*PfCCp1*rp1) und *PfCCp2* (α -*PfCCp2*rp3) sowie Antikörper gegen *PfCCp3* (α -*PfCCp3*SR2) ließen eine ko-abhängige Expression der drei Proteine in Gametozytenlysate der Klone 5YE2 (*PfCCp1*-KO), D11H (*PfCCp2*-KO) und H3D (*PfCCp3*-KO) erkennen. Dagegen zeigten *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* eine von *PfCCp4* unabhängige Expression in Gametozytenlysate des *PfCCp4*-KO-Klons L4C. Als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung aller Gelspuren diente die Immundetektion des ER-assoziierten Proteins *Pf39* (40 kDa). WT, Wildtyp; KO, *knockout*; *PfCCp1*, 185 kDa; *PfCCp2*, 185 kDa und 70 kDa; *PfCCp3*, 130 kDa.⁵⁵

Eine Abhängigkeit von *PfCCp4* ließ sich für *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* jedoch beim Vergleich der WT- und *PfCCp4*-KO-Expression nicht detektieren. Die Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung aller Gelspuren wurde durch Immundetektion unter Verwendung von polyklonalem Mausserum gegen das ER-assoziierte Protein *Pf39* angefertigt.

Zusätzlich wurde die *PfCCp1*-, *PfCCp2*- und *PfCCp3*-Expression in *PfCCp4*-KO-Parasiten mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Ihre bereits durch Western Blot nachgewiesene Expression in *PfCCp4*-KO-Gametozyten konnte verifiziert werden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass es zu keinen Veränderungen im Expressionsmuster kam. *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* ließen weiterhin eine punktierte, Oberflächen-assoziierte Expression in reifen *PfCCp4*-KO-Gametozyten erkennen, die jener im WT entsprach (Abb. 3.24).

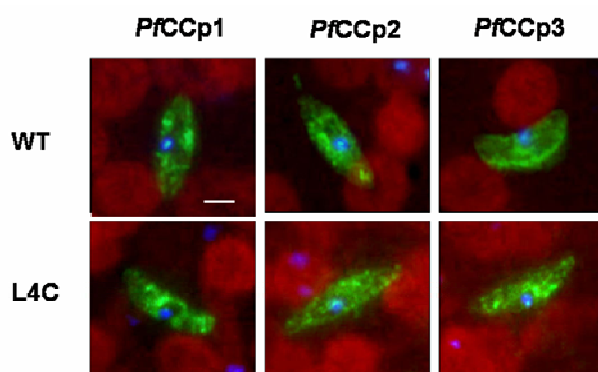


Abb. 3.24. *PfCCp4*-unabhängige Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*. Immunfluoreszenzstudien wiesen für *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* (in Grün) in Gametozyten des *PfCCp4*-KO-Klons L4C ein dem WT entsprechendes Expressionsmuster nach. Rot, Erythrozyten gegengefärbt mit *Evans Blue*; Blau, Kernmaterial angefärbt mit *Hoechst Nuclear Stain*; Größenangabe, 2 μm .⁵⁶

Ebenso erwies sich die Expression von *PfCCp4* in den entsprechenden *PfCCp*-KO-Linien als unabhängig von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*, wie durch indirekte Immunfluoreszenzstudien gezeigt werden konnte. In allen drei *PfCCp*-KO-Linien wurde eine unverändert homogene, Oberflächen-assoziierte Expression von *PfCCp4* beobachtet (Abb. 3.25).

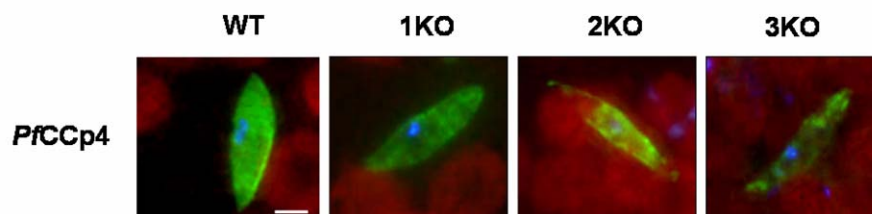


Abb. 3.25. Unveränderte *PfCCp4*-Expression in den *PfCCp1*-, *PfCCp2*- sowie *PfCCp3*-KO-Klonen 5YE2, D11H und H3D. Studien anhand indirekter Immunfluoreszenz ließen eine unverändert homogene, Oberflächen-assoziierte Expression von *PfCCp4* (in Grün) erkennen. Rot, Erythrozyten gegengefärbt mit *Evans Blue*; Blau, Kernmaterial angefärbt mit *Hoechst Nuclear Stain*; Größenangabe, 2 μm .⁵⁷

Weitere Ko-Expressionsstudien enthüllten eine Ko-Lokalisation von *PfCCp4* mit dem TBV-Kandidaten *Pfs230* innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten (Abb. 3.26).

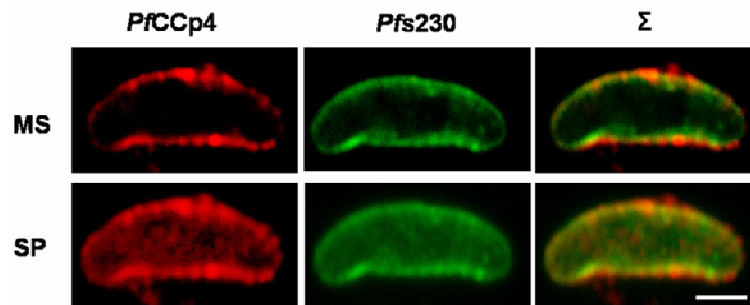


Abb. 3.26. Ko-Lokalisation von *PfCCp4* und *Pfs230*. A. Ko-Markierungs-Studien unter Verwendung von polyklonalem Kaninchenserum gegen *PfCCp4* und polyklonalem Mausserum gegen *Pfs230* deckten eine Ko-Lokalisation von *PfCCp4* (in Rot) und *Pfs230* (in Grün) innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten auf. Unter Benutzung eines konfokalen Mikroskops zeigten Stapelprojektionen (SP) eine homogene Verteilung beider Proteine an der Oberfläche von Gametozyten, während mediale Schnitte (MS) eine intrazelluläre Expression ausschlossen. Σ , Überlagerung der Einzelbilder mit Ko-Lokalisation von *PfCCp4* und *Pfs230* in Gelb. Größenangabe, 2 μm .⁵⁸

Immunfluoreszenzstudien zeigten in weiteren Ko-Markierungs-Experimenten außerdem, dass die Expression von *Pfs230* in Gametozyten des *PfCCp4*-KO unbeeinflusst bleibt (Abb. 3.27).

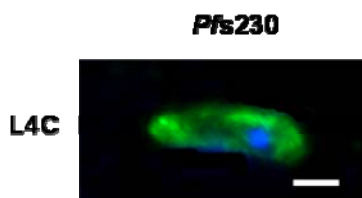


Abb. 3.27. *Pfs230*-Expression in *PfCCp4*-KO-Parasiten. Indirekte Immunfluoreszenzstudien zeigten eine unveränderte *Pfs230*-Expression in Gametozyten des *PfCCp4*-KO-Klons L4C. Blau, Kernmaterial in *Hoechst Nuclear Stain*; Größenangabe, 3 μm .⁵⁹

3.2.2 Affinitätschromatographiestudien

Als Folgeschritt der ko-abhängigen Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* sowie *PfCCp3* und Ko-Lokalisation von *PfCCp4* mit *Pfs230* schlossen sich Interaktionsexperimente an. Erste Studien wurden anhand von Affinitätschromatographien durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3.6). Dazu wurde eine Reihe von rekombinanten, domänenüberspannenden *PfCCp*-Proteinen (Abb. 3.28) in unserem Labor kloniert und entweder als 6His/SUMO- oder GST-Fusionsprotein exprimiert. Anschließend wurden die GST-Fusionsproteine mit Glutathion-Sepharose versetzt und auf einer PolyPrep[®]-Säule immobilisiert. Potentielle 6His/SUMO-fusionierte

Interaktionspartner wurden hinzu gegeben und durch PBS-Waschungen bei mangelnder Interaktion ausgespült. Im Falle einer Interaktion kam es zur Ko-Elution der GST- und 6His/SUMO-Fusionsproteine. Die Analyse der Eluatzusammensetzung erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot.

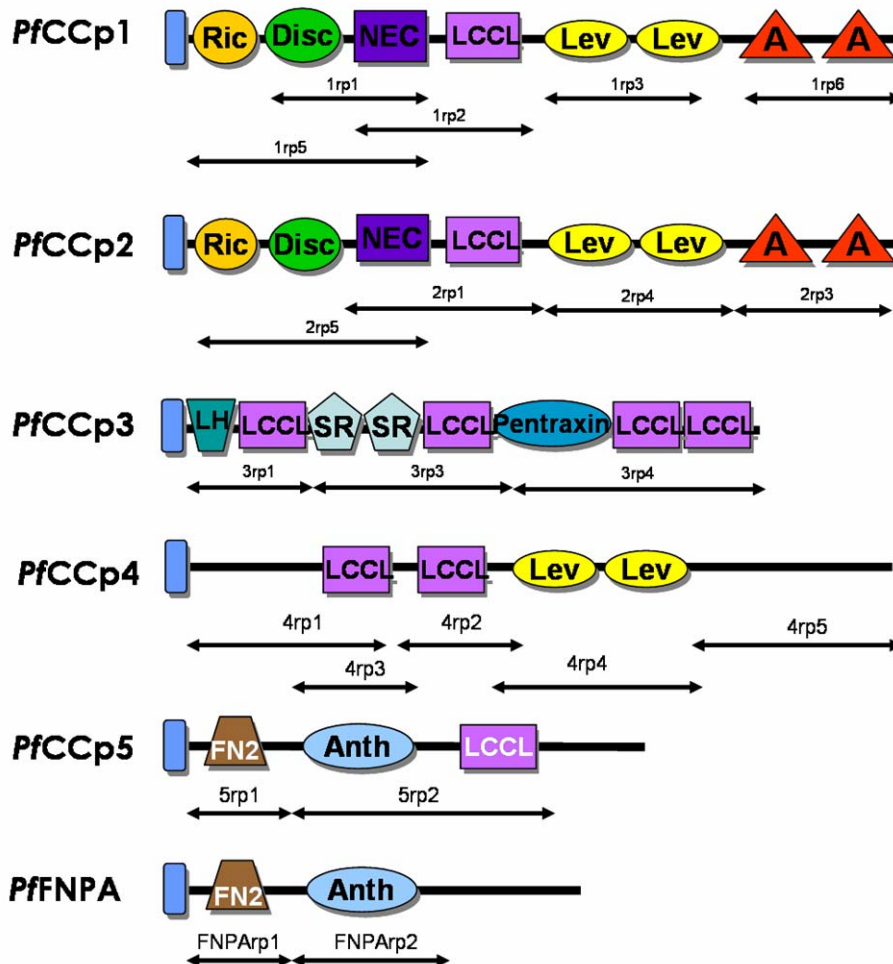
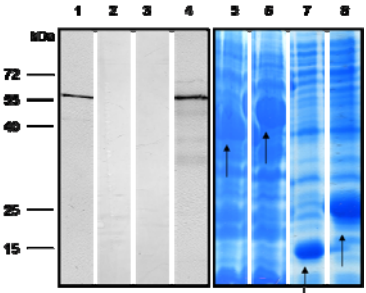
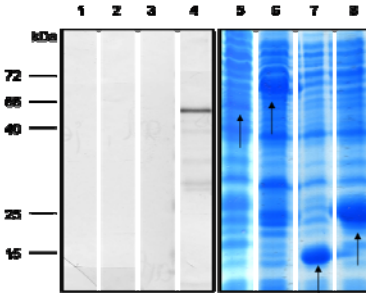
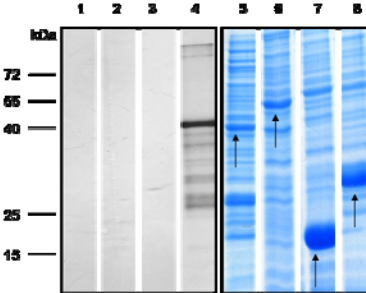
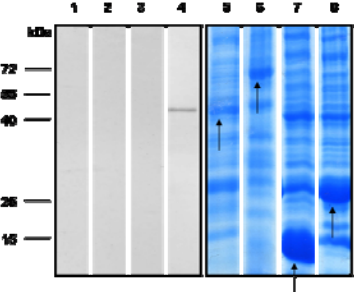
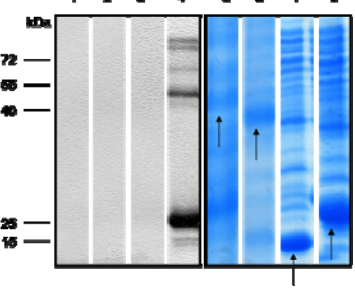
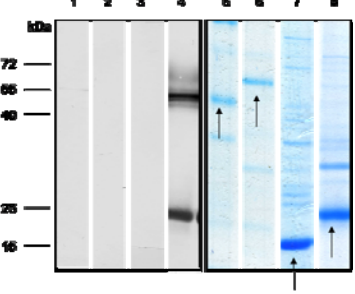


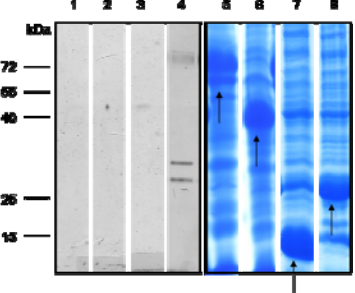
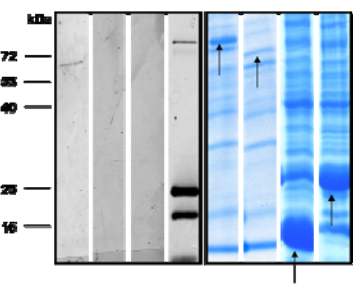
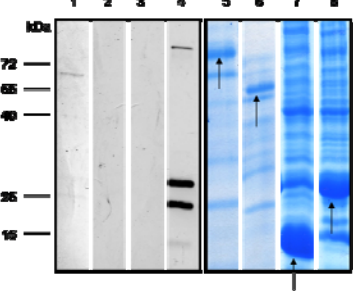
Abb. 3.28. Übersicht rekombinanter PfCCp-Proteine.⁶⁰

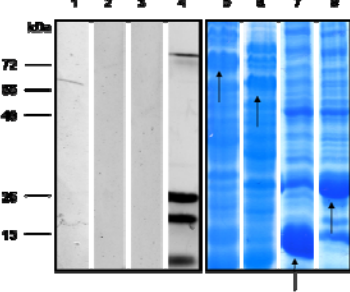
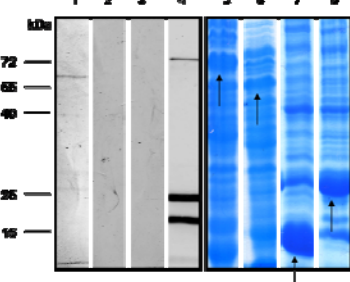
Eine Übersicht der durchgeführten Interaktionsstudien ist in Tab. 3.3 aufgeführt. Bei den Interaktionskontrollen von rekombinanten GST-Fusionsproteinen mit dem 6His/SUMO-Peptid alleine konnte in Western-Blot-Analysen erwartungsgemäß keine 6His/SUMO-Bande detektiert werden. Analog dazu konnte bei Interaktionskontrollen von rekombinanten 6His/SUMO-Fusionsproteinen mit dem GST-Peptid in Western-Blot-Analysen keine GST-Bande detektiert werden.

Tab. 3.3. Interaktionsstudien rekombinanter *PfCCp*-Proteine. Western-Blot-Analysen und Expressionskontrollgele von Affinitätschromatographiestudien deckten direkte Interaktionen zwischen rekombinanten *PfCCp*-Proteinen auf. +, Interaktion detektierbar; -, keine Interaktion nachweisbar.

Köder GST-Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrollgel	Inter- aktion	
<i>PfCCp3rp1</i> 53 kDa	<i>PfCCp1rp1</i> 53kDa	 <p>Western blot and expression control gel for <i>PfCCp3rp1</i> and <i>PfCCp1rp1</i>. The Western blot shows a band at approximately 53 kDa in lane 4, indicating interaction. The expression control gel shows bands for 3rp1-G, 1rp1-H, and GST-peptide.</p>	Anti-His-Blot 1. 3rp1-G x 1rp1-H 2. 3rp1-G x 6His/SUMO 3. GST x 1rp1-H Anti-GST-Blot 4. 3rp1-G x 1rp1-H Expressionsgel 5. 3rp1-G 6. 1rp1-H 7. 6His/SUMO-Peptid 8. GST-Peptid	+
<i>PfCCp3rp1</i> 53 kDa	<i>PfCCp1rp2</i> 59 kDa	 <p>Western blot and expression control gel for <i>PfCCp3rp1</i> and <i>PfCCp1rp2</i>. The Western blot shows a band at approximately 59 kDa in lane 4, indicating interaction. The expression control gel shows bands for 3rp1-G, 1rp2-H, and GST-peptide.</p>	Anti-His-Blot 1. 3rp1-G x 1rp2-H 2. 3rp1-G x 6His/SUMO 3. GST x 1rp2-H Anti-GST-Blot 4. 3rp1-G x 1rp2-H Expressionsgel 5. 3rp1-G 6. 1rp2-H 7. 6His/SUMO-Peptid 8. GST-Peptid	-
<i>PfCCp3rp1</i> 53 kDa	<i>PfCCp1rp3</i> 59 kDa	 <p>Western blot and expression control gel for <i>PfCCp3rp1</i> and <i>PfCCp1rp3</i>. The Western blot shows a band at approximately 59 kDa in lane 4, indicating interaction. The expression control gel shows bands for 3rp1-G, 1rp3-H, and GST-peptide.</p>	Anti-His-Blot 1. 3rp1-G x 1rp3-H 2. 3rp1-G x 6His/SUMO 3. GST x 1rp3-H Anti-GST-Blot 4. 3rp1-G x 1rp3-H Expressionsgel 5. 3rp1-G 6. 1rp3-H 7. 6His/SUMO-Peptid 8. GST-Peptid	-












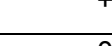

Köder GST-Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrollgel	Inter- aktion	
<i>PfCCp3rp1</i> 53 kDa	<i>PfCCp1rp5</i> 70 kDa		<p>Anti-His-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp1-G x 1rp5-H 3rp1-G x 6His/SUMO GST x 1rp5-H <p>Anti-GST-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp1-G x 1rp5-H <p>Expressionsgel</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp1-G 1rp5-H 6His/SUMO-Peptid GST-Peptid 	-
<i>PfCCp3rp1</i> 53 kDa	<i>PfCCp2rp3</i> 42 kDa		<p>Anti-His-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp1-G x 2rp3-H 3rp1-G x 6His/SUMO GST x 2rp3-H <p>Anti-GST-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp1-G x 2rp3-H <p>Expressionsgel</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp1-G 2rp3-H 6His/SUMO-Peptid GST-Peptid. 	-
<i>PfCCp3rp1</i> 53 kDa	<i>PfCCp4rp1</i> 58 kDa		<p>Anti-His-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp1-G x 4rp1-H 3rp1-G x 6His/SUMO GST x 4rp1-H <p>Anti-GST-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp1-G x 4rp1-H <p>Expressionsgel</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp1-G 4rp1-H 6His/SUMO-Peptid GST-Peptid 	-

Köder GST-Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrollgel	Inter- aktion	
<p><i>PfCCp3rp3</i> 77 kDa</p>	<p><i>PfCCp2rp3</i> 42 kDa</p>		<p>Anti-His-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp3-G x 2rp3-H 3rp3-G x 6His/SUMO GST x 2rp3-H <p>Anti-GST-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp3-G x 2rp3-H <p>Expressionsgel</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp3-G 2rp3-H 6His/SUMO-Peptid GST-Peptid 	-
<p><i>PfCCp3rp3</i> 77 kDa</p>	<p><i>PfCCp2rp4</i> 62 kDa</p>		<p>Anti-His-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp3-G x 2rp4-H 3rp3-G x 6His/SUMO GST x 2rp4-H <p>Anti-GST-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp3-G x 2rp4-H <p>Expressionsgel</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp3-G 2rp4-H 6His/SUMO-Peptid GST-Peptid 	+
<p><i>PfCCp3rp3</i> 77 kDa</p>	<p><i>PfCCp3rp3</i> 64 kDa</p>		<p>Anti-His-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp3-G x 3rp3-H 3rp3-G x 6His/SUMO GST x 3rp3-H <p>Anti-GST Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp3-G x 3rp3-H <p>Expressionsgel</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp3-G 3rp3-H 6His/SUMO-Peptid GST-Peptid 	+

Köder GST-Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrollgel	Inter- aktion	
<p><i>PfCCp3rp4</i> 72 kDa</p>	<p><i>PfCCp2rp4</i> 62 kDa</p>		<p>Anti-His-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp4-G x 2rp4-H 3rp4-G x 6His/SUMO GST x 2rp4-H <p>Anti-GST-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp4-G x 2rp4-H <p>Expressionsgel</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp4-G 2rp4-H 6His/SUMO-Peptid GST-Peptid 	+
<p><i>PfCCp3rp4</i> 72 kDa</p>	<p><i>PfCCp3rp3</i> 64 kDa</p>		<p>Anti-His-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp4-G x 3rp3-H 3rp4-G x 6His/SUMO GST x 3rp3-H <p>Anti-GST-Blot</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp4-G x 3rp3-H <p>Expressionsgel</p> <ol style="list-style-type: none"> 3rp4-G 3rp3-H 6His/SUMO-Peptid GST-Peptid 	+

Unter Einbeziehung weiterer Affinitätschromatographiestudien, die in unserem Labor von Nina Simon und Roland Frank durchgeführt wurden, konnten insgesamt folgende direkte Interaktionen rekombinanter *PfCCp*-Proteine identifiziert werden (Tab. 3.4). Besonders häufig scheinen die LCCL-Domäne und die SR-Domäne an den direkten Interaktionen der rekombinanten *PfCCp*-Proteine beteiligt zu sein. Eine eindeutige wechselseitige Interaktion einzelner Domänen ließ sich jedoch nicht identifizieren.

Tab. 3.4. Übersicht identifizierter Interaktionen zwischen rekombinanten *PfCCp*-Domänen. +, direkte Interaktion detektierbar; - keine Interaktion detektierbar; 0, nicht untersucht.

	<i>PfCCp3rp1</i> -GST 	<i>PfCCp3rp3</i> -GST 	<i>PfCCp3rp4</i> -GST 
<i>PfCCp1rp1</i> -6His/SUMO 	+	+	+
<i>PfCCp1rp2</i> -6His/SUMO 	-	+	+
<i>PfCCp1rp3</i> -6His/SUMO 	-	+	-
<i>PfCCp1rp5</i> -6His/SUMO 	-	-	+
<i>PfCCp1rp6</i> -6His/SUMO 	+	+	0
<i>PfCCp2rp3</i> -6His/SUMO 	-	+	-
<i>PfCCp2rp4</i> -6His/SUMO 	-	+	+
<i>PfCCp3rp1</i> -6His/SUMO 	-	0	0
<i>PfCCp3rp3</i> -6His/SUMO 	-	+	+
<i>PfCCp4rp4</i> -6His/SUMO 	+	+	0

3.2.3 Ko-Immunpräzitationsstudien

Um zusätzlich die Interaktion nativer *PfCCp*-Proteine zu untersuchen, wurden Ko-Immunpräzitationsstudien durchgeführt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse von *PfCCp4*-Interaktionspartnern.

Dafür wurde wie in Kapitel 2.2.3.6 beschrieben WT-Gametozytenlysat zunächst mit neutralem Mausserum vorgereinigt und anschließend mit polyklonalem Mausserum gegen *PfCCp4* versetzt. Nach der Präzitation durch ProteinG-beads wurde das Protein-bead-Gemisch durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Negativkontrollen dienten Immunpräzitationen unter Verwendung von polyklonalem Mausserum gegen das ER-assoziierte Protein *Pf39* oder polyklonalem Kaninchenserum gegen das intrazelluläre Protein *Pfalpha-Tubulin-II* männlicher Gametozyten und Gameten. Eine weitere Negativkontrolle stellte bei der Immundetektion im Western Blot die Inkubation von sekundärem anti-Maus-Antikörper ohne vorherige Primärantikörperapplikation dar. Es konnte eine Interaktion von nativem *PfCCp4* mit nativem *PfCCp1*, *PfCCp2*, *PfCCp3* und *PfFNPA* detektiert werden (Abb. 3.29). Eine Wechselwirkung von *PfCCp4* mit *PfCCp5* ließ sich nicht nachweisen.

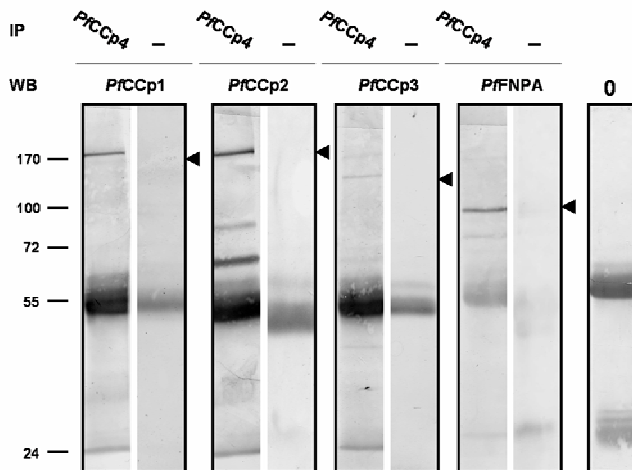


Abb. 3.29. Ko-Immünpräzipitationsstudien innerhalb der *PfCCp*-Familie mit *PfCCp4* als Köder. In Ko-Immünpräzipitationsstudien (IP) an WT-Gametozytenlysat unter Verwendung von polyklonalem *PfCCp4*-Antiserum konnte in Western-Blot-Analysen (WB) eine Interaktion von nativem *PfCCp4* mit nativem *PfCCp1* (185 kDa), *PfCCp2* (185 kDa und 70 kDa), *PfCCp3* (130 kDa) sowie *PfFNPA* (100 kDa) nachgewiesen werden. Eine Interaktion dieser Proteine mit dem ER-assoziierten Protein *Pf39* bzw. dem intrazellulären Protein *Pfal*-Tubulin-II wurde im Western Blot erwartungsgemäß nicht detektiert (-). 0, Negativkontrolle: IP mit *PfCCp1*-Antiserum, ohne Primärantikörperinkubation im Western Blot.⁶¹

In weiteren Immunpräzipitationsstudien konnte eine Interaktion von *PfCCp4* mit dem kolo-kalisierenden TBV-Kandidaten *Pfs230* detektiert werden (Abb. 3.30). Dies galt sowohl für Präzipitationen mit *PfCCp4*-Antiserum als auch in der Umkehrsituation unter Verwendung von polyklonalem *Pfs230*-Antiserum. Ebenso konnte eine schwache Interaktion von *Pfs48/45* mit *PfCCp4* verzeichnet werden, wenn *Pfs48/45*-Antiserum zum Präzipitieren verwendet wurde. Leider konnte eine Interaktionsanalyse in der Umkehrsituation nicht durchgeführt werden, da *Pfs48/45* auf Höhe der oberen Präzipitat-Antikörperbande migriert. Durch *Pf39*-Antiserum war erwartungsgemäß keine Präzipitation dieser Proteine möglich.

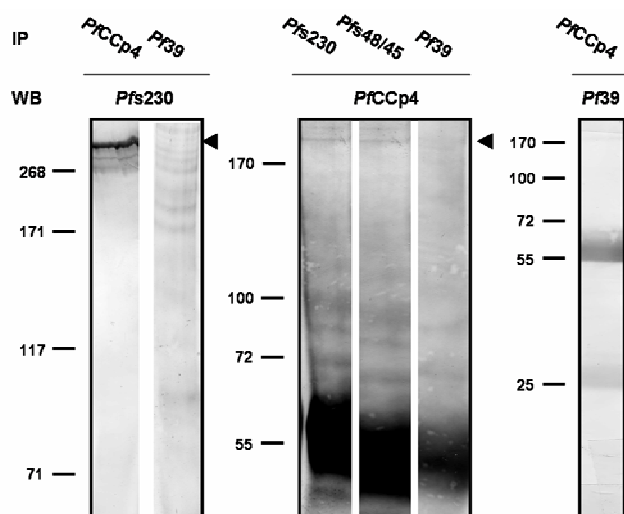


Abb. 3.30. Ko-Immünpräzipitationsstudien von *PfCCp4*, *Pfs230* und *Pfs48/45*. Ko-Immünpräzipitationsstudien (IP) an WT-Gametozytenlysat unter Verwendung von polyklonalem *PfCCp4*-Antiserum, *Pfs230*-Antiserum und *Pfs48/45*-Antiserum zeigten in Western-Blot-Analysen (WB) eine Interaktion von nativem *PfCCp4* mit *Pfs230* (360 kDa), in der Umkehrsituation von *Pfs230* mit *PfCCp4* (180 kDa), sowie eine schwache Interaktion von *Pfs48/45* mit *PfCCp4*. Eine Interaktion mit *Pf39* wurde erwartungsgemäß nicht detektiert.⁶²

Eine Interaktion von *PfCCp4* mit weiteren sexualstadienspezifischen Proteinen wie *Pfs16*, *Pfs25* und *PfPeg3* konnte durch Ko-Immünpräzipitationen nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.31). Eine Immundetektion an Gametozytenlysate diente dabei als Positivkontrolle im Western Blot.

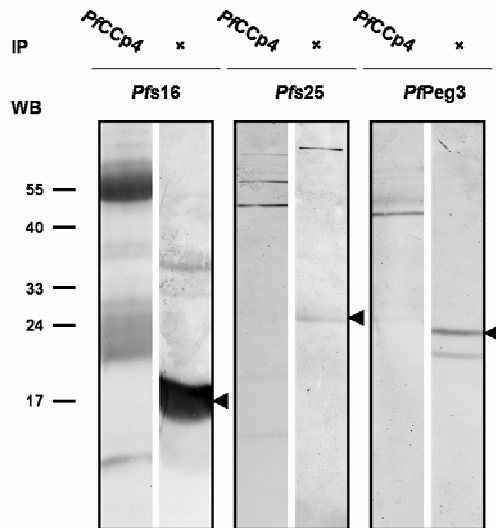


Abb. 3.31. Ko-Immünpräzipitationsstudien von *PfCCp4* und weiteren sexualstadienspezifischen Proteinen. Ko-Immünpräzipitationsstudien (IP) an WT-Gametozytenlysate unter Verwendung von polyklonalem *PfCCp4*-Antiserum zeigten in Western-Blot-Analysen (WB) keine Interaktion von nativem *PfCCp4* mit *Pfs16* (16 kDa), *Pfs25* (25 kDa) oder *PfPeg3* (Doppelbande bei 25 kDa). +, Positivkontrolle an Gametozytenlysate.⁶³

3.2.4 Zelladhäsionsstudien

Weitere Interaktionsstudien befassten sich mit dem Adhäsionsvermögen rekombinanter *PfCCp*-Proteine an Sexualstadien von *P. falciparum*. Eine Auswahl der in Kapitel 3.2.2 identifizierten *PfCCp*-Interaktionsdomänen wurde hierfür auf ihre Bindungsaffinität an *P. falciparum*-Gameten untersucht. Gameten könnten nach der Freisetzung der *PfCCp*-Proteine während der Exflagellation reifer Gametozyten als potentielle Bindungspartner eine Schlüsselrolle einnehmen und standen daher im Mittelpunkt der Analysen. Fluoreszierende Latex-beads wurden für diese Studien mit rekombinanten *PfCCp*-Proteinen beschichtet (Abb. 3.32) und auf ihre Affinität zu Makrogameten untersucht (Abb. 3.33).

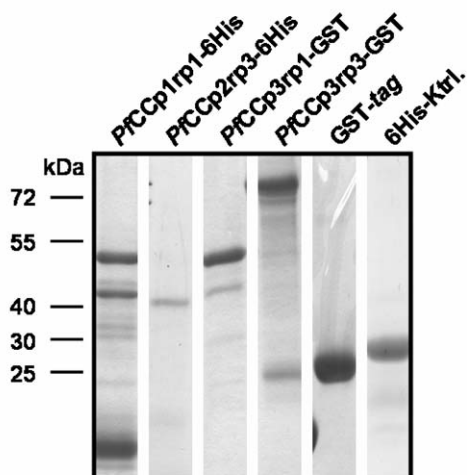


Abb. 3.32. Aufreinigung rekombinanter *PfCCp*-Proteine für Zelladhäsionsstudien. Die aufgereinigten Proteine *PfCCp1rp1-6His*/SUMO (53 kDa), *PfCCp2rp3-6His*/SUMO (42 kDa), *PfCCp3rp1-GST* (53 kDa), *PfCCp3rp3-GST* (77 kDa), sowie das 6His-5-Helix-Protein (30 kDa) und das GST-Peptid (26 kDa) als Negativkontrolle wurden zur Beschichtung von fluoreszierenden Latex-beads verwendet.⁶⁴

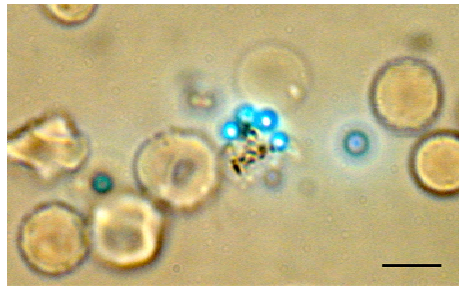


Abb. 3.33. Zelladhäsion *PfCCp*-beschichteter, fluoreszierender *Latex-beads* (in Blau) an einen Makrogameten. Größenangabe, 8 μm .⁶⁵

Die Quantifizierung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung durch das Auszählen von jeweils zwanzig Gesichtsfeldern in mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen pro rekombinantes Protein (siehe Kapitel 2.2.3.6). Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die rekombinanten Proteine *PfCCp1rp1-6His/SUMO*, *PfCCp2rp3-6His/SUMO*, *PfCCp3rp1-GST* sowie *PfCCp3rp3-GST* an etwa ein Viertel der Makrogameten anlagerten, während die Negativkontrollen keine spezifischen Wechselwirkungen erkennen ließen (Abb. 3.34). Die Adhäsion der untersuchten rekombinanten *PfCCp*-Proteine an Makrogameten war im Vergleich zur Bindung an Erythrozyten als Hintergrundbestimmung deutlich erkennbar.

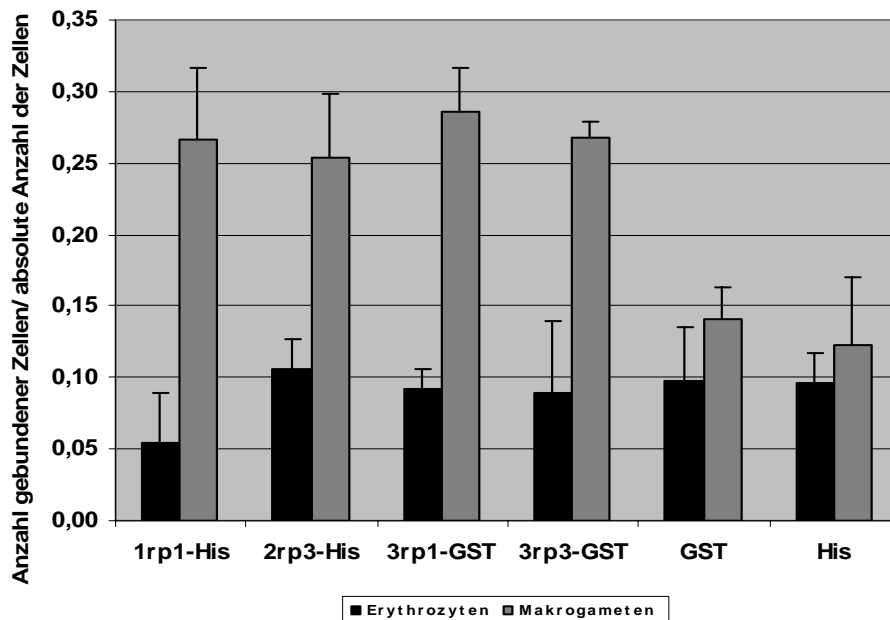


Abb. 3.34. Zelladhäsionsstudien rekombinanter *PfCCp*-Proteine. Die rekombinanten Proteine *PfCCp1rp1-6His/SUMO*, *PfCCp2rp3-6His/SUMO*, *PfCCp3rp1-GST* sowie *PfCCp3rp3-GST* zeigten im Vergleich zur Hintergrundbindung an Erythrozyten und zur unspezifischen Bindung des GST- bzw. 6His-Peptids eine ausgeprägte Affinität zu Makrogameten.⁶⁶

4 Diskussion

4.1 Expression und Funktion von *PfCCp4* während der Sexualphase von *Plasmodium falciparum*

Bis heute ist es weitgehend unverstanden, welche molekularen Mechanismen eine Subpopulation von Schwestermerozoiten dazu veranlassen, sich zu Gametozyten zu differenzieren, zu reifen und schließlich die Gametogenese einzuleiten (Übersichtsartikel Talman *et al.*, 2004; Alano und Billker, 2005). Bekannt ist bisher ausschließlich, dass diese Prozesse durch eine genau festgelegte Expressionsabfolge sexualstadienspezifischer Proteine reguliert werden (Übersichtsartikel Alano, 2007; Pradel, 2007). Zu ihnen gehören die Mitglieder der kürzlich identifizierten *PfCCp*/LAP-Proteinfamilie, die aufgrund einer gemeinsamen LCCL-Domäne *PfCCp1* bis *PfCCp5* benannt wurden (Delrieu *et al.*, 2002; Lasonder *et al.*, 2002; Dessens *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2004, 2006; Templeton *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2006; Scholz *et al.*, 2005, 2007). Obwohl dem sechsten Mitglied, *PfFNPA*, die namensgebende Domäne fehlt, wurde es aufgrund seiner ausgeprägten Ähnlichkeit zu *PfCCp5* in die *PfCCp*-Familie integriert (Pradel *et al.*, 2004, 2006; Trueman *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2005, 2007). Da alle sechs Gene eine Signalpeptidsequenz, jedoch keine Sequenzen für Transmembrandomänen oder einen GPI-Anker besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass die kodierten Proteine sekretiert werden. Ihr komplexer Aufbau aus multiplen Adhäsionsdomänen deutet zusätzlich auf eine Beteiligung an Protein-, Lipid- oder Polysaccharidinteraktionen hin (Übersichtsartikel Pradel, 2007). Dabei könnte die Erkennung von Wirtsrezeptoren oder die Ausbildung parasitärer Protein-Protein-Wechselwirkungen eine zentrale Rolle spielen.

Erste Charakterisierungen der *PfCCp*-Familie zeigten, dass *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* sexualstadienspezifisch exprimiert werden und in der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten lokalisiert sind (Delrieu *et al.*, 2002; Pradel *et al.*, 2004; 2006; Scholz *et al.*, 2007). Die Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* beschränkt sich dagegen auf die Zellpole reifer Gametozyten (Scholz *et al.*, 2007). Immunfluoreszenzstudien ließen außerdem erkennen, dass *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* während der Gametenbildung partiell freigesetzt werden und in einer matrixähnlichen Struktur Exflagellationszentren umgeben (Pradel *et al.*, 2004). In KO-Studien erwiesen sich *PfCCp2* und *PfCCp3* des Weiteren als essentielle Faktoren für die Migration reifer Sporozoiten aus den Mitteldarmoozysten in die Speicheldrüsen der Mücken (Pradel *et al.*, 2004). Dadurch erfüllen diese beiden Proteine zwei grundlegende Kriterien für TBV-Kandidaten: sexualstadienspezifische Expression und eine essentielle Funktion während der Parasitenentwicklung in der Mücke. Aufgrund dieser

viel versprechenden Daten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Analyse der *PfCCp*-Familie durch Charakterisierung von *PfCCp4* und Interaktionsstudien fortgesetzt. Nach RT-PCR-Studien und Herstellung polyklonaler Antiseren gegen rekombinante Proteine von *PfCCp4* konnte durch proteinbiochemische und zellbiologische Analysen gezeigt werden, dass das bisher hypothetische Protein *PfCCp4* ebenso wie *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* ein hohes Expressionsniveau in Gametozyten aufweist (Scholz *et al.*, 2007). Während *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* jedoch punktiert in Gametozyten der Stadien II bis V exprimiert werden, konnte bei detaillierten Studien zur Expression und Proteinlokalisierung von *PfCCp4* durch Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie eine homogene Assoziation von *PfCCp4* mit der Plasmamembran von Gametozyten detektiert werden. Diese beginnt bereits in Gametozyten des Stadium I und hält bis zum Stadium V an, wo *PfCCp4* innerhalb der parasitophoren Vakuole exprimiert wird. Ebenso konnte gezeigt werden, dass *PfCCp4* im Gegensatz zu *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* bei der Gametogenese nicht freigesetzt wird, sondern sein homogenes Expressionsmuster auch auf Makrogameten fortsetzt. Während die Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* außerdem im Zuge der Gametogenese rasch nachlässt, wird *PfCCp4* nach einem Expressionstief im Zygotenstadium im Laufe der Ookinetenreifung erneut exprimiert. Dabei ähnelt sein Expressionsmuster in reifen Ookineten jenem in Gametozytenstadien durch eine homogene, Oberflächen-assoziierte Verteilung. Eine Expression in asexuellen Stadien konnte innerhalb der *PfCCp*-Familie nur für *PfCCp5*, und hier nur in einer Subpopulation von Schizonten detektiert werden (Scholz *et al.*, 2007).

Für *PfCCp4* konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten mit dem TBV-Kandidaten *Pfs230* ko-lokalisiert, der ebenfalls in Assoziation mit dem gametozytären Plasmalemma exprimiert wird (Quakyi *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1995). Erst kürzlich wurde veröffentlicht, dass *Pfs230* die Bindung von Mikrogameten an uninfizierte Erythrozyten während der Exflagellation vermittelt (Eksi *et al.*, 2006). Beim Ausbrechen der Gametozyten aus Erythrozyten wird *Pfs230* außerdem proteolytisch prozessiert und partiell in das umgebende Medium freigesetzt (Übersichtsartikel Pradel, 2007). Dabei kommt es zur Spaltung des 360-kDa-großen *Pfs230*-Proteins zwischen einer Glutamat-reichen Region und der darauf folgenden Cystein-reichen Domäne, wodurch auf Gameten zwei Oberflächenproteine mit einem Molekulargewicht von 307 kDa und 300 kDa entstehen (Williamson *et al.*, 1996). Parallel dazu werden zwei Peptide mit einer Größe von 47 kDa und 35 kDa ins umgebende Medium freigesetzt. Studien unter Verwendung von E64d, einem Cysteinprotease-Inhibitor, verhinderte die Bildung der 300- und 35-kDa-Fragmente, während es weiterhin zur Produktion der beiden anderen Proteine kam. Der Inhibitor E64 zeigte dagegen keinen Effekt auf die *Pfs230*-Prozessierung (Brooks und Williamson, 2000). Diese Daten sind im Hinblick auf die funktionale Charakterisierung der

PfCCp-Proteine durch Interaktionsstudien höchst interessant und werden im Verlauf dieser Diskussion wieder aufgegriffen.

Khan *et al.* hatten im Jahre 2005 *PbCCp/LAP*-spezifische Promotorstudien mittels GFP (*green fluorescent protein*) als Reporterprotein durchgeführt und dabei eine ausschließlich weibliche Expression der *PfCCp*-Orthologe *PbCCp1/LAP2* und *PbCCp3/LAP1* in *P. berghei* beobachtet. In Übereinstimmung damit berichteten Raine *et al.* 2007 von einer weiblichen Vererbung der *PbCCp/LAP*-Gene. Dafür waren Kreuzungsstudien von *PbCCp/LAP*-KO-Parasiten und *Pbs47*-KO-Mutanten bzw. *Pbs48/45*-KO-Mutanten durchgeführt worden, die entweder keine weiblichen oder keine männlichen Gameten bilden können. Bei jedem Ansatz erhielten Mücken entweder eine Mischung aus den verschiedenen KO-Gametozytenkulturen durch Membranfütterung oder sie konnten direkt eine Blutmahlzeit an Mäusen aufnehmen, die mit den unterschiedlichen Mutanten infiziert worden waren. Nur bei Kreuzungen von *PbCCp1/LAP2*-, *PbCCp2/LAP4*-, *PbCCp3/LAP1*- oder *PbCCp4/LAP6*-KO-Parasiten mit *Pbs48/45*-KO-Mutanten, die zwar keine männlichen, aber dennoch weibliche Gameten bilden können, kam es zur Produktion von Sporozoiten in den Speicheldrüsen der Mücke. Daraus wurde geschlossen, dass für eine vollständige Entwicklung des Parasiten in der Mücke bei der Befruchtung eine intakte Kopie eines *PbCCp/LAP*-Gens von weiblichen Gameten stammen muss (Raine *et al.*, 2007).

Trotz detaillierter Immunfluoreszenzstudien ließ sich in *P. falciparum* jedoch keine eindeutige Aussage über eine geschlechtsspezifische *PfCCp*-Expression während der Gametozytogenese treffen. In Ko-Markierungs-Studien unter Verwendung von Antiseren gegen *Pfs25* (Oberflächenprotein von Makrogameten und Zygoten mit geringem Expressionsniveau in Gametozyten; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990), *Pfal*-Tubulin-II (Protein männlicher Gameten, ebenfalls mit geringem Expressionsniveau in Gametozyten; Rawlings *et al.*, 1992) und *PFMR5* (Paralog von *Pfs230* in männlichen Gametozyten; Eksi und Williamson, 2002) konnte gezeigt werden, dass die *PfCCp*-Proteine am Beispiel von *PfCCp1* und *PfCCp4* in Gametozyten beider Geschlechter exprimiert werden, wobei jedoch eine verstärkte Expression in Makrogametozyten und Makrogameten zu beobachten war (Scholz *et al.*, 2007). In exflagellierenden Mikrogameten konnte dagegen keine *PfCCp*-Expression detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass sich im Zuge der Gametogenese eine geschlechtsspezifische Expression einstellt, wie sie für die orthologen Proteine in *P. berghei* bereits im Gametozytenstadium vermutet wird.

Weitere Unterschiede zwischen den beiden *Plasmodium*-Spezies treten im generellen Expressionsmuster der *PCCp/LAP*-Proteine auf. So wurde für *PbCCp3/LAP1* nicht nur eine Expression in Gametozyten, sondern auch in allen anderen Parasitenstadien, beginnend bei den asexuellen Blutstadien bis hin zu Speicheldrüsen Sporozoiten, festgestellt (Claudianos *et al.*, 2002; Trueman *et al.*, 2004). Ebenso ließen sich *PbCCp1/LAP2* und *PbCCp2/LAP4* im

Gegensatz zu ihren *P. falciparum*-Orthologen durch Proteomanalysen neben Gametozyten auch in Ookineten und Oozysten detektieren; eine *PbCCp4/LAP6*-Expression wurde zusätzlich in Sporozoiten beobachtet (Trueman *et al.*, 2004). Zu ähnlichen Ergebnissen kam das Labor von Prof. Dr. T. J. Templeton am WMC durch quantitative RT-PCR-Analysen aller *PbCCp*-Transkripte sowie durch Expressionsanalyse mittels *PbCCp1/LAP2*- bis *PbCC4/LAP6*-spezifischer Promotorregionen und GFP als Reporterprotein (mündliche Kommunikation Prof. Dr. T. J. Templeton). Für alle *PbCCp/LAP*-Gene konnte eine Expression nicht nur in Gametozyten, sondern auch in Oozysten fünf, zehn und 15 Tage nach einer Membranfütterung von *Anopheles*-Mücken nachgewiesen werden. Die Transkriptmenge war in Oozysten jedoch deutlich geringer als in Gametozyten. Dementsprechend konnte zwar eine starke Expression der *PbCCp/LAP*-GFP-Konstrukte in Gametozyten, jedoch nicht in Oozysten verzeichnet werden. Im Gegensatz zu den Daten von Trueman *et al.* (2004) wurde keine *PbCCp/LAP*-Expression in asexuellen Parasiten oder in Sporozoiten detektiert.

Der mangelnde Nachweis der *PfCCp*-Expression in den Mückenstadien von *P. falciparum* könnte bei den durchgeführten Immundetektionen theoretisch auf einen Verlust der entsprechenden Epitope durch Prozessierung oder durch eine Konformationsänderung der Proteine zurück zu führen sein (Trueman *et al.*, 2004). Eine abschließende Klärung des Sachverhaltes könnte durch den Einsatz von Antiseren gegen verschiedene Domänen der jeweiligen *PfCCp*-Proteine bei Expressionsstudien erreicht werden, ebenso wie durch RT-PCR-Analysen an Mückenstadien.

Neben den Unterschieden im Expressionsprofil sprechen weitere Indizien dafür, dass die *PCCp/LAP*-Proteine trotz ihrer konservierten Architektur in *P. berghei* und *P. falciparum* nicht völlig identisch fungieren. Wie bereits erwähnt, ergaben Studien an jeweils zwei verschiedenen *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Klonen in mehreren unabhängigen Experimenten, dass sich die Mutanten bis zur Sporozoitenentwicklung in den Mitteldarmoozysten völlig normal entwickeln konnten (Pradel *et al.*, 2004). Etwa zwölf Tage nach der Membranfütterung von *Anopheles*-Mücken waren sowohl die Anzahl der Oozysten, als auch ihre Morphologie und die Bildung von Sporozoiten innerhalb der Oozysten mit dem WT vergleichbar. Der KO-Phänotyp manifestierte sich erst bei der vollständig blockierten Migration der *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Sporozoiten aus den Oozysten in die Speicheldrüsen der Mücke. In *P. berghei* konnte dagegen bereits ab dem Oozystenstadium eine abnorme Entwicklung beobachtet werden. Zwar bildeten sich ebenso viele *PbCCp1/LAP2*-, *PbCCp3/LAP1*- und *PbCCp4/LAP6*-KO-Oozysten wie im WT. Bereits sieben Tage nach der Membranfütterung waren sie jedoch signifikant größer als die gleichaltrigen WT-Oozysten; ein Effekt, der sich im Verlauf der Infektionsdauer verstärkte (Claudianos *et al.*, 2002; Raine *et al.*, 2007). Lichtmikroskopische Analysen später Oozysten zeigten im Falle der *PbCCp1/LAP2*-, *PbCCp2/LAP4*-, *PbCCp3/LAP1*- und *PbCCp4/LAP6*-KO-Parasiten anschließend zwei verschiedene Sub-

populationen: ein Teil erinnerte an unreife WT-Oozysten, der andere Teil erschien im Vergleich zum WT durch starke Vakuolenbildung degeneriert (Claudianos *et al.*, 2002; Trueman *et al.*, 2004; Raine *et al.*, 2007). Studien anhand von Transmissionselektronenmikroskopie lokalisierten die Vakuolenbildung im ER (Raine *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte eine unvollständige Organisation des Kernmaterials in *PbCCp/LAP*-KO-Oozysten festgestellt werden. Während in WT-Oozysten bereits die Sporozoitenbildung stattgefunden hatte, waren in den gleichaltrigen KO-Oozysten nur wenige, jedoch große Nuklei erkennbar (Raine *et al.*, 2007). Zu ähnlichen Ergebnissen kam man in Prof. Dr. T. J. Templetons Labor am WMC in Studien mit Doppel-KO-Mutanten in *P. berghei* (mündliche Kommunikation Prof. Dr. T. J. Templeton). In jeweils drei unabhängigen Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken mit *PbCCp1/PbCCp3*- und *PbCCp1/PbCCp4*-Doppel-KO-Mutanten wurde ebenfalls keine Beeinträchtigung der Parasitenentwicklung bis zum Oozystenstadium festgestellt. Lichtmikroskopische Analysen zeigten jedoch anschließend auch hier eine Degeneration durch Vakuolenbildung und eine vollständige Inhibition der Sporozoitenproduktion. Eine zusätzliche Beeinträchtigung der Parasitenentwicklung durch das Ausschalten zweier *PbCCp/LAP*-Gene war jedoch nicht detektierbar.

Trotz Differenzen im Phänotyp von *PfCCp*- bzw. *PbCCp/LAP*-KO-Parasiten besitzen alle bisher charakterisierten Mitglieder der *PCCp/LAP*-Familie aufgrund ihrer essentiellen Rolle bei der Sexualentwicklung von Plasmodien bemerkenswertes Potential im Hinblick auf TBV-Strategien. Die *PfCCp4*-KO-Studien im Rahmen dieser Arbeit ließen dagegen erkennen, dass es sich bei *PfCCp4* um kein essentielles Gen für die Parasitenentwicklung in der Mücke handelt. In fünf unabhängigen Membranfütterungen konnte sowohl eine normale Oozysten- als auch eine vollständige Sporozoitenbildung innerhalb der Oozysten verzeichnet werden. Die Sporozoiten waren ebenfalls mehrheitlich in der Lage, die Speicheldrüsen zu infizieren (Scholz *et al.*, 2007). Eine ähnlich redundante Funktion wurde kürzlich für das sexualstadienspezifische Protein *Pfs47* beschrieben, das auf der Oberfläche weiblicher Gametozysten und Gameten exprimiert wird. Obwohl sein Paralog, *Pfs48/45*, für die Fruchtbarkeit männlicher Gameten unerlässlich ist (van Dijk *et al.*, 2001), wird die Parasitentransmission durch das Ausschalten von *Pfs47* nicht beeinträchtigt (van Schaijk *et al.*, 2006). Theoretisch könnten eine Rückmutation und der damit verbundene Verlust der KO-Vektorintegration einen unauffälligen KO-Phänotyp erklären. Da es sich dabei jedoch um ein höchst seltenes Ereignis handelt (Tsai *et al.*, 2001) und im Rahmen dieser Studie bei allen fünf unabhängigen *PfCCp4*-KO-Klonen ein ähnlicher Phänotyp zu beobachten war, kann diese Möglichkeit jedoch ausgeschlossen werden (Scholz *et al.*, 2007).

4.2 Molekulare Wechselwirkungen von *PfCCp*-Proteinen während der Sexualphase von *Plasmodium falciparum*

Kürzlich wurde in unserem Labor gezeigt, dass *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* eine ko-abhängige Expression sowie Ko-Lokalisation in reifen Gametozyten aufweisen (Pradel *et al.*, 2006). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass es in *PfCCp3*-KO-Parasiten trotz unveränderten Transkriptlevels ebenfalls zu keiner Expression von *PfCCp1* und *PfCCp2* kam (Pradel *et al.*, 2006). Zusammen mit der Tatsache das *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* im Zuge der Gametogenese partiell freigesetzt werden und die entstehenden Exflagellationszentren matrixähnlich umgeben (Pradel *et al.*, 2004), legen diese Daten die Vermutung nahe, dass *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* unter Bildung eines Komplexes interagieren (Pradel *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2006). Das Fehlen von *PfCCp3* könnte dabei zur Destabilisierung, Degradierung und letztendlich zum Verlust von *PfCCp1* und *PfCCp2* in *PfCCp3*-KO-Parasiten führen. Die Theorie der Komplexbildung konnte von Wagner *et al.* (2006) durch erste Interaktionsstudien an rekombinanten *PfCCp*-Domänen und den Nachweis direkter Interaktionen zwischen ihnen untermauert werden. Ähnliche Wechselwirkungen gametozytenspezifischer Adhäsionsproteine wurden bereits für *Pfs48/45* und *Pfs230* beschrieben. Die beiden Proteine ko-lokalisieren innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten und bilden an der Plasmamembran einen stabilen Komplex, in dem das sekretierte *Pfs230*-Protein an das GPI-verankerte *Pfs48/45* bindet (Kumar, 1987; Kumar und Wikel, 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die ko-abhängige Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* durch Western-Blot-Analysen, auch im erst kürzlich hergestellten *PfCCp1*-KO-Klon 5YE2, bestätigt. Zusätzlich konnte eine Abhängigkeit von *PfCCp5* und *PfFNPA* von *PfCCp1*, *PfCCp2*, *PfCCp3* und *PfCCp4* festgestellt werden (M.-A. Dude, unveröffentlichte Daten). Eine Abhängigkeit von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* von *PfCCp4* konnte jedoch nicht identifiziert werden. Ebenso zeigte *PfCCp4* in Immunfluoreszenzstudien eine von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* unabhängige Expression in den entsprechenden *PfCCp*-KO-Gametozyten. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Expression von *Pfs230* im *PfCCp4*-KO unbeeinflusst bleibt, obwohl beide Proteine ko-lokalisieren und während der Sexualentwicklung des Parasiten interagieren, wie in Ko-Immunpräzipitationsstudien an WT-Gametozytenlysate gezeigt werden konnte. In weiteren Immunpräzipitationsstudien wurde zudem eine Wechselwirkung von *PfCCp4* und *Pfs48/45* detektiert.

Das Fehlen einer essentiellen *PfCCp4*-Funktion ist aufgrund seiner Interaktionen mit *Pfs230* und *Pfs48/45* umso erstaunlicher, da sowohl *Pfs230*- als auch *Pfs48/45*-KO-Mutanten in ihrer Sexualentwicklung deutlich inhibiert sind. Das Abschalten von *Pfs230* und *Pfs48/45* führt in beiden Fällen zur beträchtlichen Reduktion der Fertilisationsrate und der Zygoten-

bzw. Oozystenbildung (van Dijk *et al.*, 2001; Eksi *et al.*, 2006). Während *Pfs48/45*-KO-Mikrogameten ihre Fähigkeit verlieren, Makrogameten zu befruchten (van Dijk *et al.*, 2001), können *Pfs230*-KO-Mikrogameten keine Zell-Zell-Kontakte zu Erythrozyten mehr herstellen, wodurch die Bildung von Exflagellationszentren stark beeinträchtigt wird (Eksi *et al.*, 2006). Interaktionen von *Pfs230* und Glycophorin A, einem Oberflächenprotein von Erythrozyten, das an der Ausbildung von Exflagellationszentren beteiligt ist (Templeton *et al.*, 1998) konnten hingegen durch Immunpräzipitation nicht festgestellt werden (Eksi *et al.*, 2006).

Obwohl *Pfs230* und *Pfs48/45* auf der Oberfläche von Gametozyten und Gameten einen Komplex bilden (Kumar *et al.*, 1987; Kumar und Wizel, 1992), wurde in Studien zur ko-abhängigen Expression der beiden Proteine keine Beeinträchtigung der *Pfs48/45*-Expression in *Pfs230*-KO-Parasiten festgestellt (Eksi *et al.*, 2006). Aktuelle Studien in unserem Labor zeigen außerdem, dass diese *Pfs230*-unabhängige Expression auch für *PfCCp1* bis *PfCCp4* gilt. *PfCCp5* wird zwar ebenfalls in *Pfs230*-KO-Parasiten exprimiert, seine Expression ist jedoch nicht mehr nur auf die Zellpole von *Pfs230*-KO-Gametozyten beschränkt. Eine mögliche ko-abhängige Expression von *PfFNPA* muss noch untersucht werden (I. Rupp, unveröffentlichte Daten).

Analoge Ergebnisse konnten für die *PfCCp*-Expression in *Pfs48/45*-KO-Parasiten beobachtet werden (I. Rupp, unveröffentlichte Daten). Da *Pfs48/45* für *Pfs230* jedoch die Verankerung auf der Zelloberfläche darstellt, kommt es auf der Oberfläche von *Pfs48/45*-KO-Gameten zum Verlust von *Pfs230* (Eksi *et al.*, 2006). Dementsprechend liegt der Verdacht nahe, dass die Interaktion von *PfCCp4* mit *Pfs230* bzw. *Pfs48/45* über ein Brückenprotein vermittelt wird, das so wie *PfCCp4* selbst unabhängig von *Pfs230* und *Pfs48/45* exprimiert wird. Wechselwirkungen von *PfCCp4* mit weiteren sexualstadienspezifischen Proteinen wie *Pfs16* (Moelans *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1994; Bruce *et al.*, 1994), *Pfs25* (Vermeulen *et al.*, 1985, 1986) und *PfPeg3* (Silvestrini *et al.*, 2005; Lanfracotti, *et al.*, 2007) konnten durch Ko-Immunpräzipitation bisher jedoch nicht identifiziert werden. Tab. 4.1 fasst noch einmal die ko-abhängigen Expressionsprofile unter Einbeziehung der jüngsten Daten zusammen.

Tab. 4.1. Ko-abhängiges Expressionsprofil von Adhäsionsproteinen während der Befruchtungsvorgänge in *P. falciparum*. ++, normale Expression; +, reduzierte Expression; -, keine Expression; 0, Analyse steht noch aus.

	<i>PfCCp1</i> -KO	<i>PfCCp2</i> -KO	<i>PfCCp3</i> -KO	<i>PfCCp4</i> -KO	<i>Pfs230</i> -KO	<i>Pfs48/45</i> -KO
<i>PfCCp1</i>	-	-	-	++	++	++
<i>PfCCp2</i>	-	-	-	++	++	++
<i>PfCCp3</i>	-	-	-	++	++	++
<i>PfCCp4</i>	++	++	++	-	++	++
<i>PfCCp5</i>	-	+	+	+	+	+
<i>PfFNPA</i>	-	+	+	+	0	0

Unter Verwendung nativer PfCCp-Proteine aus Gametozytenlysat ließen sich in unserem Labor durch Ko-Immünpräzipitation Interaktionen zwischen allen PfCCp-Proteinen nachweisen. In einem weiteren Versuchansatz mittels Affinitätschromatographie rekombinanter PfCCp-Proteine konnten diese Wechselwirkungen als direkte Interaktionen von PfCCp-Domänen untereinander identifiziert werden. Von besonderer Bedeutung scheinen dabei sowohl die LCCL-Domäne als auch die SR-Domäne zu sein. Bei allen sechzehn detektierten Interaktionen zwischen rekombinanten Proteinen von PfCCp1 bis PfCCp4 war die LCCL-Domäne anwesend, in neun Fällen die SR-Domäne (56 %). Bei nur sechs Wechselwirkungen enthielten die rekombinanten Proteine die NEC-Domäne (38 %), bei fünf Interaktionen die Pentraxin- bzw. Lev-Domäne (31 %). An einem Viertel der Interaktionen war die Disc-Domäne beteiligt, bei nur 19 % bzw. 6 % die LH- und ApicA-Domäne bzw. die Ric-Domäne. Kürzlich konnten in unserem Labor auch für PfCCp5 und PfFNPA direkte Wechselwirkungen nachgewiesen werden (M.-A. Dude, unveröffentlichte Daten). Eine eindeutige wechselseitige Interaktion ließ sich wegen des teils inkonsistenten Bindungsverhaltens der im bakteriellen System exprimierten rekombinanten Proteine jedoch nicht bestimmen.

In der Literatur wurde die SR-Domäne bereits als Protein-bindendes Motiv beschrieben (Whitney *et al.*, 1995; Delrieu *et al.*, 2002; Claudianos *et al.*, 2002). Häufig tritt diese kleine, über Disulfidbrücken stabilisierte Strukturkomponente im extrazellulären Teil von membran- gebundenen oder sekretierten Proteinen in einer Vielzahl von Spezies auf (Übersichtsartikel Aruffo *et al.*, 1997). In Vertebraten wurde sie sowohl als Bestandteil von Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen entdeckt als auch in sekretierten Proteinen, die an Abwehrmechanismen des Wirts beteiligt sind (Aruffo *et al.*, 1997; Resnick *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1990). Zusätzlich findet sich die SR-Domäne in Proteinen, die eine Rolle bei der Regulation der Komplementkaskade oder der Bindung und Phagozytose bei Pathogeninvasion spielen (Goldberger *et al.*, 1987; Elomaa *et al.*, 1998). In Invertebraten wurde von Proteinen berichtet, die die SR-Domäne enthalten und als Oberflächenzellrezeptor, z.B. in Schwämmen, Zell-Zell-Kontakte vermitteln (Blumbach *et al.*, 1998). Weitere extrazelluläre Proteine in Schwämmen und Seeigeln, die über die SR-Domäne verfügen, zeigen eine Assoziation mit Sperma oder Coelomozyten, primitiven Immunzellen (Müller, 1997; Pancer, 2000). Insgesamt legen diese Daten in Kombination mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Resultaten berechtigterweise die Vermutung nahe, dass die SR-Domäne an Protein-Protein-Interaktionen der PfCCp-Proteine beteiligt sein könnte.

Der LCCL-Domäne wurde hingegen bisher nur eine Polysaccharid-bindende Eigenschaft zugeschrieben (Muta *et al.*, 1991). Entdeckt wurde dieses Motiv erstmals im so genannten Faktor C, dem Zymogen einer sekretierten Serinprotease im Pfeilschwanzkrebs *Limulus* (Muta *et al.*, 1991). Später wurde es ebenfalls als Bestandteil des humanen, kochleären

Proteins Coch-5b2 und des Lungenreifungsproteins Lgl1 in der Ratte identifiziert (Robertson *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1999). Von diesen drei Proteinen erhielt die Domäne schließlich ihren Namen (Trexler *et al.*, 2000; siehe Markierungen). Eine funktionelle Charakterisierung des Motivs steht zwar noch aus, Proteine, die es enthalten, geben jedoch einen Anhaltspunkt über mögliche Funktionsbereiche. So konnte bisher z.B. gezeigt werden, dass Faktor C in *Limulus* die Bindung des Endotoxins LPS gramnegativer Bakterien vermittelt, wodurch eine Koagulationskaskade als Abwehrmechanismus des Wirts initiiert wird. An diesem Prozess scheint besonders jene N-terminale Region des Faktors C beteiligt zu sein, in der sich das LCCL-Modul befindet, welches somit bei der Bindung des Polysaccharids LPS eine Rolle spielen könnte (Nakamura *et al.*, 1988; Muta *et al.*, 1991; Trexler *et al.*, 2000). Des Weiteren finden sich im Lungenreifungsprotein Lgl1, das auch in Mensch und Maus identifiziert werden konnte, neben dem LCCL-Motiv andere Domänen, denen eine Beteiligung an einer antikörperunabhängigen, antimikrobiellen Abwehr zugesprochen werden könnte (Niderman *et al.*, 1995; Kjeldsen *et al.*, 1996; Trexler *et al.*, 2000); die Details sind jedoch weitgehend unverstanden. Über die Funktion des humanen Coch-5b2-Proteins, das mit einer Taubheitsform namens DFNA9 in Verbindung gebracht wird, ist ebenfalls nur sehr wenig bekannt. Es wird vermutet, dass es über zwei Regionen, die Homologien zu von-Willebrand-Typ-A-Domänen aufweisen, an Komponenten der extrazellulären Matrix bindet (Robertson *et al.*, 1997, 1998). Da Typ-A-Domänen jedoch ebenso in Proteinen vielfältiger Abwehrmechanismen wie Hämostase und Regulation des Komplementsystems, sowie des Immunsystems zu finden sind, wäre auch eine Beteiligung von Coch-5b2 und damit der LCCL-Domäne an diesen Abläufen denkbar (Colombatti und Bonaldo, 1991; Colombatti *et al.*, 1993). Die Resultate der in dieser Arbeit durchgeführten Affinitätschromatographien weisen neben der beschriebenen Fähigkeit Polysaccharide zu binden, zusätzlich auf ein Potential des LCCL-Motivs zur Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen hin.

Zu den Domänen, die als rekombinante *PfCCp*-Proteine keine besonders ausgeprägte Bindungsaffinität zeigten, zählt das NEC-Modul. Neben der LCCL-Domäne gilt es ebenfalls als Polysaccharid-bindende Proteinkomponente (Pradel *et al.*, 2004). Es wurde im Zuge der *PfCCp*-Charakterisierung erstmals als allein stehendes Motiv identifiziert und nach zwei im Tierreich hoch konservierten Oberflächenproteinen benannt, in denen es enthalten ist: den Neurexinen und den Kollagenen. Auch bei weiteren, in Affinitätschromatographien nur wenig bindungsaktiven Domänen namens Ricin, Discoidin und Levanase handelt es sich um Module, die laut Literatur bevorzugt mit Polysacchariden in Verbindung treten (Baumgartner *et al.*, 1998; Ponting und Russell, 2000). Dies könnte die geringe Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei den hier durchgeführten Experimenten erklären. Der LH-Domäne wird dagegen sowohl eine Beteiligung an Protein-Protein- als auch an Protein-Lipid-Interaktionen zugeschrieben (Bateman und Sandford, 1999; Delrieu *et al.*, 2002; Claudianos

et al., 2002). Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Verantwortlich könnte dafür eine möglicherweise inkorrekte Proteinfaltung oder mangelnde Modifikation durch die Expression der Domäne als rekombinantes Protein im bakteriellen System sein. Über das Bindungsverhalten der ApicA-Domäne und des Pentraxin-Moduls ist bisher nichts bekannt. Während die ApicA-Domäne ausschließlich in der PfCCp-Familie auftritt (Pradel *et al.*, 2004), findet sich das Pentraxin-Motiv zusätzlich in einer Proteinfamilie, die an der Ausbildung einer akuten Immunantwort samt Agglutination, Komplementaktivierung und Phagozytose beteiligt ist (Bharadwaj *et al.*, 2001; Claudianos *et al.*, 2002). Die Resultate im Rahmen dieser Arbeit legen jedoch die Vermutung nahe, dass beide Motive keine ausgeprägte Bindungsaffinität an Proteine besitzen.

In einem abschließenden Versuchansatz wurde die Bindung rekombinanter PfCCp-Proteine an Sexualstadien von *P. falciparum* betrachtet. Da Makrogameten nach der Freisetzung der PfCCp-Proteine während der Exflagellation reifer Mikrogametozyten als potentielle Bindungspartner eine Schlüsselrolle einnehmen könnten, standen sie im Mittelpunkt der Untersuchungen. In den Zelladhäsionsexperimenten an fixierten WT-Gametenkulturen konnte gezeigt werden, dass sich rekombinante PfCCp-Proteine, die bereits in Affinitätschromatographiestudien an einer direkten Interaktionen beteiligt waren, an etwa ein Viertel der analysierten Makrogameten anlagerten. Die Interaktionsrate der rekombinanten PfCCp-Proteine könnte dabei vom Reifegrade der Makrogameten, z.B. durch die An- oder Abwesenheit eines Oberflächenproteins, abhängig sein.

Während Mikrogametozyten nach Induktion der Exflagellation ihr Genom dreimal replizieren, von einem haploiden in einen oktaploiden Zustand wechseln und acht flagellenartige Mikrogameten bilden, lässt sich bei Makrogametozyten ausschließlich ein Ausbrechen aus ihrer Erythrozytenhülle sowie ein Abrunden beobachten (Sinden, 1983; Sinden und Hartley, 1985; Janse *et al.*, 1986, 1988). Dass sich jedoch im Laufe von etwa 20 Minuten bis zur Vollendung der Gametenbildung auch in Makrogameten weitere Differenzierungsschritte vollziehen, zeigen u. a. erst kürzlich veröffentlichte Ergebnisse über die RNA-Helikase DOZI (*development of zygote inhibited*) in *P. berghei*: sie bildet in Gametozyten mit *Pb25*- sowie *Pb28*-mRNA einen Komplex, der die Translation bis zur Induktion der Gametogenese reprimiert (Mair *et al.*, 2006). Zwar wird dadurch während der Gametogenese eine rasche Proteinproduktion gewährleistet, die korrekte Proteinlokalisierung oder -prozessierung könnte jedoch einen Zeitfaktor darstellen, der zu einer Variation im Reifegrad von Makrogameten führen könnte. In diesem Zusammenhang konnte in vorliegender Arbeit durch Immunfluoreszenzstudien auch beobachtet werden, dass *Pfs25* in unaktivierten Gametozyten im Zytoplasma vesikulär exprimiert wird, während in reifen, aktivierten Gametozyten neben der vesikulären Expression ebenso eine beginnende, jedoch nicht schlagartige Oberflächenassoziation detektierbar war. Eine Variation der PfCCp-Bindungs-

affinität bzw. ihrer Interaktionsrate mit Makrogameten wäre aufgrund einer nicht synchronisierten Reifung während der Gametogenese somit durchaus denkbar.

Insgesamt lassen die vorliegenden Daten darauf schließen, dass ausgewählte Mitglieder der PfCCp-Familie sowohl durch Protein-Protein-Interaktionen innerhalb ihrer Familie, als auch durch Wechselwirkung mit anderen sexualstadienspezifischen Proteinen - z.B. innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten und auf der Oberfläche von Gameten - eine wichtige Rolle bei den Befruchtungsvorgängen in *P. falciparum* spielen.

4.3 Die Rolle der PfCCp-Proteine während der Befruchtungsvorgänge in *Plasmodium falciparum* - eine Arbeitshypothese

Die ko-abhängige Expression von PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3, ihre partielle Freisetzung während der Gametogenese nach Induktion der Exflagellation, sowie der Nachweis, dass alle PfCCp-Proteine nicht nur miteinander, sondern besonders im Falle von PfCCp4 auch mit anderen sexualstadienspezifischen Proteinen wie Pfs230 und Pfs48/45 interagieren, führten zu folgender Hypothese (Abb. 4.1):

Nach der Differenzierung von Sexualstadien aus asexuellen Parasiten, dem Durchlaufen der Gametozytogenese und der Induktion der Gametogenese werden zwei unterschiedliche Prozesse initiiert. Zum einen kommt es zum vielfach beschriebenen Ausbrechen der Mikrogametozyten aus den Erythrozyten und zur Exflagellation bis hin zur Bildung von Mikrogameten. Diese nehmen im exflagellierenden Zustand Zellkontakt zu parasitierten und unparasitierten Erythrozyten auf und bilden dadurch große Zellansammlungen, die lichtmikroskopisch leicht erkennbar sind. Zum anderen wird gemäß der Hypothese unseres Labors parallel dazu ein zweiter, bisher nicht in der Literatur behandelter Prozess ausgelöst. Dabei werden, besonders beim Ausbrechen von Makrogametozyten aus Erythrozyten, sexualstadienspezifische Adhäsionsproteine wie die Mitglieder der PfCCp-Familie, Pfs230, Pfs48/45 oder Pfs25 einzeln oder bereits als Proteinkomplexe aus der parasitophoren Vakuole freigesetzt bzw. an der Oberfläche von Gameten exponiert. Anschließend bilden mindestens PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 durch Interaktionen eine matrixähnliche Struktur, in der sie Exflagellationszentren aus Erythrozyten, Gametozyten sowie Gameten umgeben und mit anderen freigesetzten oder Oberflächen-assoziierten Proteinen in Kontakt treten. Begleitet werden diese Abläufe von Proteinprozessierungen durch Proteasen, wie bereits für die Spaltung und partielle Freisetzung von Pfs230 während der Gametogenese gezeigt werden konnte (Williamson *et al.*, 1996; Brooks und Williamson, 2000). Vor kurzem wurde in

unserem Labor zusätzlich die Prozessierung von *PfCCp1* und *PfCCp3* im Laufe dieser Entwicklungsphase nachgewiesen. In Inhibierungsstudien wurde außerdem festgestellt, dass eine Reihe von Proteasen an der Bildung von Exflagellationszentren beteiligt ist. Neben Cystein-Proteasen scheinen ebenso Serin-Proteasen, Aspartat-Proteasen sowie Metallo-Proteasen eine essentielle Rolle zu spielen (Torres *et al.*, 2005, Rupp *et al.*, in Druck). Während für Falcipain-1, eine Cystein-Protease, in KO-Studien bereits gezeigt werden konnte, dass sie zwar keinen Einfluss auf die Exflagellation von Mikrogameten, aber dennoch auf die Bildung von Oozysten ausübt (Eksi *et al.*, 2004), steht die funktionale Charakterisierung der meisten anderen Proteasen noch aus.

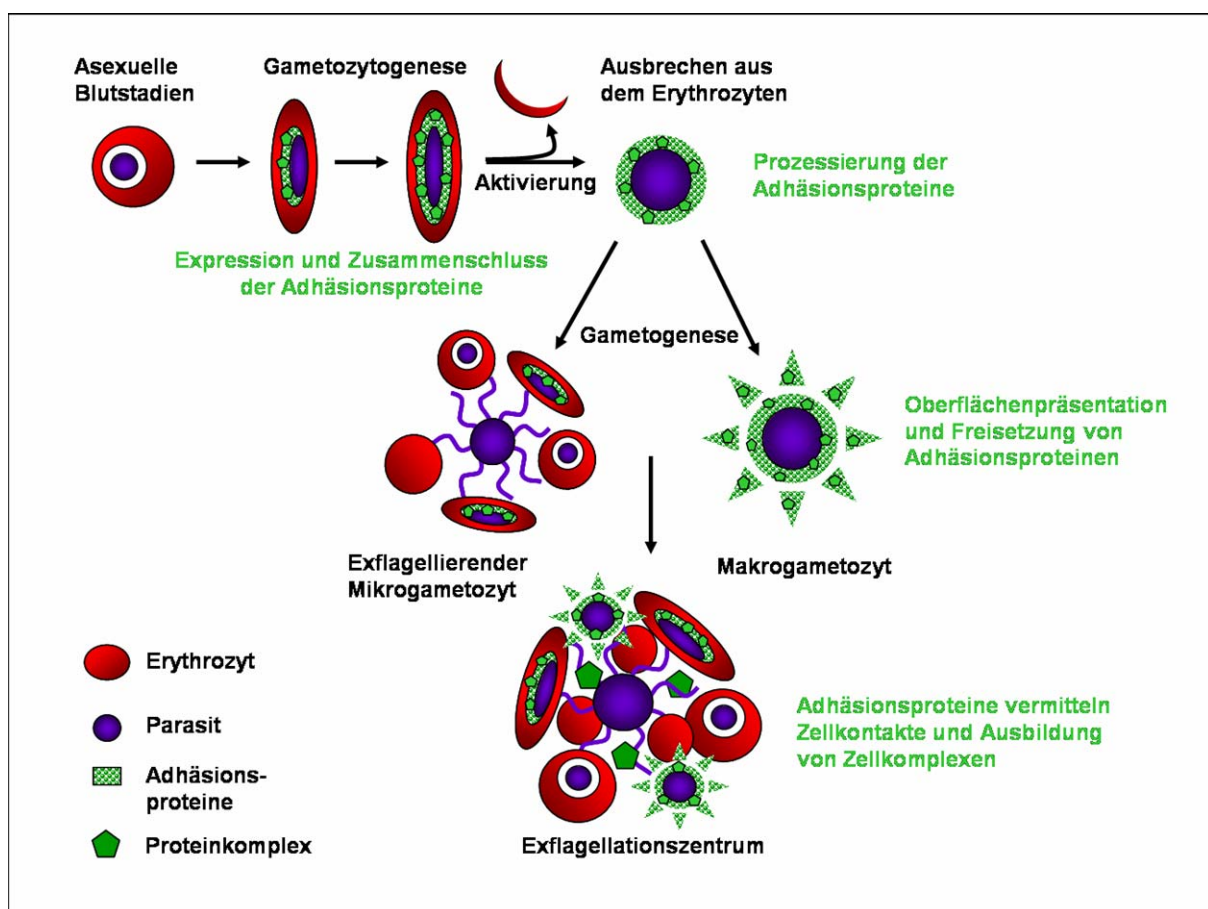


Abb. 4.1. Hypothese der Proteinkomplexbildung während der Sexualphase von *P. falciparum*.⁶⁷

Die Funktion der matrixähnlichen Proteinkomplexe bzw. der Protein-Protein-Interaktionen unter *PfCCp*-Beteiligung ist bisher ungeklärt. Eine Aufgabe der Matrixstruktur könnte darin bestehen, die räumliche Nähe von männlichen und weiblichen Gameten zu vermitteln, um eine rasche Fertilisation im widrigen Milieu des Mückenmitteldarms zu begünstigen. Dem widerspricht jedoch der Phänotyp der *PfCCp2*- bzw. *PfCCp3*-KO-Parasiten. Würden die Proteine tatsächlich eine essentielle Funktion für die Befruchtung ausüben, wäre die

Parasitenentwicklung nicht erst bei der Sporozoitenmigration aus den Oozysten in die Speicheldrüsen inhibiert, sondern bereits bei der Zygotenbildung.

Eine weitere mögliche Funktion der PfCCp-Proteine könnte eine Beteiligung an einem Immunevasionsmechanismus darstellen. Sexualstadien von *P. falciparum* werden bei einer Blutmahlzeit im Mitteldarm der Mücke nicht nur spezifischen Antikörpern, sondern auch den Faktoren des Komplementsystems ohne schützende Erythrozytenhülle ausgesetzt. PfCCp-Proteine könnten dabei eine Blockierung oder Maskierung von Bindungsstellen des Immunsystems vermitteln und dadurch die Abwehrmechanismen des Wirts außer Kraft setzen. In diesem Zusammenhang befassen sich aktuelle Studien in unserem Labor mit Interaktionsanalysen von PfCCp-Proteinen und Faktor H, der Zellen durch seine Oberflächenbindung vor einem Angriff durch Komponenten des Komplementsystems schützen kann (Übersichtsartikel Pangburn, 2000). Dennoch müssten die PfCCp-Proteine auch bei diesen Abläufen eine redundante Rolle spielen, da es bei ihrem Verlust in KO-Studien zu keiner geringeren Fertilisationsfrequenz kommt. Dies würde erwartet, wenn durch das Fehlen der PfCCp-Proteine die Sexualstadien verstärkt dem Angriff des Komplementsystems ausgesetzt wären und somit ihre Zahl reduziert würde. Der PfCCp2- bzw. PfCCp3-KO-Phänotyp müsste somit auf eine weitere Funktion der PfCCp-Proteine zurückgeführt werden.

Es wäre denkbar, dass durch die direkten und indirekten Interaktionen der PfCCp-Mitglieder Proteinkomplexe entstehen, die Rezeptor-Liganden-Gebilde oder multimere Liganden darstellen. Durch ihre Bindung an Sexualstadien von *Plasmodium* - wie sie im Rahmen dieser Arbeit bereits zwischen rekombinanten PfCCp-Proteinen und Makrogameten gezeigt wurde - könnte es zur Induktion einer Signalkaskade kommen. Am Ende dieser Kaskade könnte wiederum die Regulation eines Transkriptionsfaktors stehen, der erst im späteren Verlauf der Parasitenentwicklung, z.B. bei der Sporozoitenreife, eine Rolle spielt. Ein verzögerter Effekt durch Signaltransduktion könnte demnach eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen PfCCp-Expression in Gametozyten und Phänotypmanifestation des PfCCp2- und PfCCp3-KO im viel späteren Sporozoitenstadium liefern.

Das Wissen um Signalwege, die an der Entwicklung der Sexualstadien in *Plasmodium* beteiligt sind, ist jedoch nur sehr vage. Es steht jedoch außer Frage, dass diese Form der Informationsweitergabe während der Befruchtungsvorgänge von *Plasmodium* eine zentrale Rolle spielt, da die Gamogonie selbst durch Umwelteinflüsse induziert wird und somit notwendigerweise von der Übermittlung äußerer Bedingungen ins Zellinnere abhängig ist (Übersichtsartikel Alano, 2007). So werden z.B. als Auslöser für die Induktion der Sexualstadien Stressfaktoren durch das Wirtsimmunsystem (Motard *et al.*, 1993), Steroide und Kortikosteroide (Lingnau *et al.*, 1993), Anämie (Nacher *et al.*, 2002) sowie ein erhöhter Retikulozytenspiegel (Trager und Gill, 1992; Trager *et al.*, 1999) diskutiert. Als parasitäre Faktoren kommen hohe Parasitämie und Hämolyse (Schneweis *et al.*, 1991) sowie autokrine

Faktoren in Frage (Williams, 1999; Dyer und Day, 2003). Über die Regulation ist jedoch nur wenig bekannt (Übersichtsartikel Alano, 2007; Pradel, 2007). Häufig konnte allerdings eine Reduktion der Gametozytenbildung *in vitro* bei Deletionen im subtelomeren Bereich des neunten Chromosoms festgestellt werden (Day *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1994).

Zusätzlich wurden Signale identifiziert, die zur Exflagellation männlicher Gametozyten führen, wie der Kohlenstoffdioxidgehalt der Umgebung (Nijhout und Carter, 1978), ein Senken der Inkubationstemperatur bzw. ein Anstieg des pH-Wertes (Sinden, 1983; Billker *et al.*, 1997) und die Anwesenheit von Xanthurensäure (Billker *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1998). Und ebenso finden sich biochemische Anhaltspunkte, dass diese Signale eine Aktivierung von zyklischem GMP, phosphoinositol- und kalziumabhängigen Signalkaskaden nach sich ziehen (Kawamoto *et al.*, 1990, 1993; Ogwan'g *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1994). Die Details einer solchen Signalkaskade liegen jedoch ebenfalls weiterhin im Dunkeln. Gleiches gilt für eine kalziumabhängige Proteinkinase in *P. berghei*, *PbCDPK4*, deren Relevanz für die Bildung männlicher Gameten durch Studien mittels reverser Genetik identifiziert wurde (Übersichtsartikel Alano, 2007). Die Aktivierung dieser Kinase durch Xanthurensäure führt gemäß Billker *et al.* (2004) zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, wodurch wiederum die Replikation in Mikrogametozyten reguliert wird. Auch hier gilt es, die expliziten Abläufe zu erforschen.

Es folgte die Identifikation weiterer Kinasen wie *Pbmap-2* (Rangarajan *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005; Tewari *et al.*, 2005), *Pfnek-3* (Lye *et al.*, 2006), *Pfnek-1* (Dorin *et al.*, 2001), *Pfmap-2* (Dorin *et al.*, 1999), *Pbnek-4* (Khan *et al.*, 2005; Reininger *et al.*, 2005) und *PbCDPK3* (Ishino *et al.*, 2006; Siden-Kiamos *et al.*, 2006). Während *Pbmap-2* als Regulator der Zytokinese in männlichen Gameten beschrieben wurde (Rangarajan *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005; Tewari *et al.*, 2005), konnte für sein *P. falciparum*-Homolog *Pfmap-2* gezeigt werden, dass es *in vitro* durch die Kinasen *Pfnek-3* (Lye *et al.*, 2006) und *Pfnek-1* (Dorin *et al.*, 2001) phosphoryliert wird (Dorin *et al.*, 1999). Eine weitere Folge des gleichen Signalwegs scheint in Zygoten die Regulation der DNA-Replikation durch die NIMA-ähnliche Kinase *Pbnek-4* darzustellen (Khan *et al.*, 2005; Reininger *et al.*, 2005). Die Kinase *PbCDPK3* ist dagegen offenbar für die Beweglichkeit und Infektiösität von Ookineten von Bedeutung (Ishino *et al.*, 2006; Siden-Kiamos *et al.*, 2006).

Insgesamt verdeutlichen diese Daten, dass der plasmodialen Sexualphase ein äußerst kompliziertes Netz aus Signalwegen zugrunde liegt, an dem auch die *PfCCp*-Proteine als extrazelluläre Signalgeber durch die Bildung von Rezeptor-Liganden-Gebilden oder multimeren Liganden und ihre Bindungsaffinität zu Makrogameten einen Anteil haben könnten.

4.4 Potential der PfCCp-Proteine als TBV-Komponenten

Erst in den letzten zwei Jahrzehnten rückte die Sexualphase von *Plasmodium* als Angriffsziel transmissionsblockierender Strategien ins Licht des wissenschaftlichen Interesses, da deren Bekämpfung lange Zeit weder dem Wohl der Patienten, noch der Ausrottung der Mücke zuträglich zu sein schien (Übersichtsartikel Carter, 2001; Richie und Saul, 2001; Kaslow, 2002). Ziel von TBV ist es, im Menschen eine ausreichende Antikörperproduktion gegen sexuelle Parasitenantigene zu aktivieren, um die Parasitenentwicklung in der Mücke, möglicherweise unter Beteiligung des Komplementsystems, zu blockieren (Carter *et al.*, 2000; Carter, 2001; Stowers und Carter, 2001; Kaslow, 2002). Dies soll dazu dienen, die Ausbreitung der Krankheit zu reduzieren oder im Idealfall vollständig zu inhibieren. Eine Herausforderung stellt bei dieser Strategie die Identifizierung von Proteinen dar, die nicht nur in der Sexualentwicklung des Parasiten eine essentielle Rolle spielen, sondern als Antigen zusätzlich im Zwischenwirt Mensch ausreichend immunogen wirken.

Zu den ersten sexualstadienspezifischen Proteinen, die vor etwa zwei Jahrzehnten entdeckt wurden, zählt das Protein *Pfs25* (Vermeulen *et al.*, 1985, 1986; Kaslow *et al.*, 1988). Zehn Jahre später wurde sein Paralog *Pfs28* identifiziert (Duffy und Kaslow, 1997). In Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken konnte bereits gezeigt werden, dass Antikörperkombinationen gegen *Pfs25* und *Pfs28* die Transmission von *P. falciparum* durch Unterdrückung der Oozystenbildung vollständig inhibieren (Kaslow *et al.*, 1988; Kaslow, 1997; Duffy und Kaslow, 1997). Durch nasale Immunisierung von Mäusen mit *Pfs25* konnte sogar ein vollständiger Schutz gegen *P. falciparum* aufgebaut werden (Arakawa *et al.*, 2005). In ersten klinischen Studien im Menschen zeigte sich jedoch, dass rekombinant exprimiertes *Pfs25* alleine keine ausreichende immunogene Wirkung entfaltet (Kaslow und Shiloach, 1994; Zou *et al.*, 2003). Daher wird derzeit nach geeigneten Adjuvantien zur Optimierung der Immunantwort gesucht. Erste Erfolge wurden in Rhesusaffen erzielt, in denen eine *Pfs25*-induzierte Immunabwehr die Transmission des Parasiten in der Mücke völlig blockierte (Wu *et al.*, 2006).

Als sehr viel versprechend gilt heute auch das bereits häufiger erwähnte, sexualstadienspezifische Protein *Pfs230* (Reiner *et al.*, 1983; Quakyi *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1993, 1995). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Immunseren gegen dieses Protein die Infektiosität der Mücken gegenüber *P. falciparum* deutlich senken (Williamson *et al.*, 1995). *In vitro* inhibiert die Zugabe von anti-*Pfs230*-Antikörpern zu exflagellierenden Kulturen in Gegenwart von aktivem Serum die Gametenbildung sogar vollständig (Read *et al.*, 1994; Healer *et al.*, 1997; Williamson, 2003). Nach DNA-Impfung von Mäusen vermittelte besonders eine so genannte Region C, die sich über die ersten Cystein-reichen Module

erstreckt (Bustamante *et al.*, 2000), verbunden mit einem zusätzlichen GPI-Anker einen hohen IgG-Spiegel (Fanning *et al.*, 2003).

Ebenso stellt *Pfs48/45* einen potentiellen Kandidaten für TBV-Strategien dar (Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Kocken *et al.*, 1993). Bei männlichen *P48/45*-KO-Mutanten war, wie bereits erwähnt, die Motilität und Fähigkeit Makrogameten zu befruchten stark eingeschränkt (van Dijk *et al.*, 2001). In Mäusen induzierte vor allem eine Region aus zehn Cysteinen von *Pfs48/45* eine starke Immunantwort, deren Antikörper transmissionsblockierend wirkten (Outchkourov *et al.*, 2007). In Feldstudien zeigte sich außerdem, dass Malariapatienten dazu fähig sind, Antikörper sowohl gegen *Pfs230* als auch gegen *Pfs48/45* zu bilden (Williamson, 2003).

Ein weiteres sexualstadienspezifisches Protein aktueller TBV-Forschung ist *Pfs16*. Es befindet sich in der Membran der parasitophoren Vakuole und wird ab dem Stadium I der Gametozytogenese exprimiert (Moelans *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1994; Bruce *et al.*, 1994). In KO-Studien konnte gezeigt werden, dass es in der Sexualentwicklung des Malariaerregers eine wichtige Rolle zu spielen scheint, da der Verlust von *Pfs16* zu einer Reduktion der Gametozytenbildung und der Exflagellationsrate männlicher Gametozyten führte (Kongkasuriyachai *et al.*, 2004). Ebenso verfügt *Pfg27*, das in Gametozyten ab dem Stadium II exprimiert wird, über viel versprechendes Potential als TBV-Komponente (Alano *et al.*, 1991; Lobo *et al.*, 1994). Bei *Pfg27* handelt es sich um ein intrazelluläres Protein, das phosphoryliert wird (Kumar, 1997) und als Homodimer einzelsträngige RNA binden kann (Sharma *et al.*, 2003). Durch das Unterbinden seiner Expression konnte in KO-Parasiten die Reifung von Gametozyten durch Vakuolenbildung vollständig blockiert werden (Lobo *et al.*, 1999). Das Protein *PCTRP* (Trottein *et al.*, 1995), das in den Mikronemen von Ookineten exprimiert wird, scheint dagegen eine essentielle Rolle bei der Infektiosität von Ookineten zu spielen. Schaltet man sein zugehöriges Gen aus, so können die KO-Parasiten das Mitteldarmepithel nicht mehr durchdringen und keine Oozysten ausbilden (Templeton *et al.*, 2000; Dessens *et al.*, 1999; Yuda *et al.*, 1999). Ein ähnlicher Phänotyp wurde für KO-Parasiten der Proteine *PbMOAP/PPLP3-* (Kadota *et al.*, 2004), *PbPLP5* (Ecker *et al.*, 2007), *WARP* (Yuda *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004) und *PbSOAP* (Dessens *et al.*, 2003) beobachtet. Auch bei dem Verlust von *PfCHT1* kommt es zu einer reduzierten Infektionsrate des Mückenmitteldarms (Tsai *et al.*, 2001; Dessens *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen *PfCHT1* die Transmission des Parasiten in der Mücke inhibieren (Li *et al.*, 2005). Gegenstand aktueller Forschung sind des Weiteren die sexualstadienspezifischen Proteine *PfMR5* (Eksi und Williamson, 2002), *Pfpeg-3* sowie *Pfpeg-4* (Silvestrini *et al.*, 2005; Lanfracotti *et al.*, 2007).

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich im Hinblick auf TBV-Strategien mit den Mitgliedern der *PfCCp*-Familie. Sie bestehen aus multiplen Adhäsionsdomänen, die in ihrer außer-

gewöhnlichen Kombination im Stamm der Apikomplexa nicht nur eine hohe Konservierung, sondern ebenso eine erstaunliche Einzigartigkeit aufweisen (Templeton *et al.*, 2004; Pradel und Templeton, 2006). Dies deutet auf eine essentielle Funktion der PfCCp-Proteine während der Parasitenentwicklung hin, wie sie bereits für PfCCp2 und PfCCp3 gezeigt werden konnte. Kombiniert mit dem sexualstadienspezifischen Expressionsprofil und der Beteiligung an der Ausbildung von multimeren Proteinkomplexen, lassen diese Daten darauf schließen, dass ausgewählte Mitglieder der PfCCp-Familie über ein viel versprechendes Potential als Komponenten transmissionsblockierender Vakzine verfügen. Bestätigung findet dies in aktuellen Exflagellationsinhibitionsexperimenten in unserem Labor. Diese ergaben, dass polyklonale Antikörper gegen verschiedene PfCCp-Domänen unter Komplementbeteiligung die Ausbildung von Exflagellationszentren *in vitro* signifikant beeinträchtigen (Scholz *et al.*, 2007). Dies entspricht den Daten für Pfs230 (s. o., Read *et al.*, 1994; Healer *et al.*, 1997; Williamson, 2003). Interessanterweise konnte in unserem Labor außerdem gezeigt werden, dass sich dieser Effekt unter Verwendung von Pfs230-Antikörpern und aktivem Serum in PfCCp4-KO-Parasiten bis hin zur völligen Inhibition der Exflagellation verstärkt (Scholz *et al.*, 2007). Dies deutet darauf hin, dass Pfs230 bei Verlust von PfCCp4 für seine Antikörper freier zugänglich sein könnte, und bestätigt somit erneut eine Interaktion der beiden Proteine.

Insgesamt bieten die hier diskutierten Ergebnisse genügend Anreize für detailliertere Charakterisierungen der PfCCp-Funktion, um das Verständnis ihrer Rolle während der Sexualphase von *P. falciparum* zu fördern und das Potential ausgewählter PfCCp-Mitglieder als Untereinheit transmissionsblockierender Vakzine weiter zu erforschen.

5 Ausblick

Ausgewählte Mitglieder der PfCCp-Multiadhäsionsdomänenfamilie besitzen aufgrund ihrer sexualstadienspezifischen Expression und essentiellen Funktion während der Parasitenentwicklung in der Mücke viel versprechendes Potential für Komponenten transmissionsblockierender Vakzine. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass PfCCp-Antiseren in Anwesenheit von aktivem Serum *in vitro* die Exflagellation partiell inhibieren. Nun sollen Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken an humanem Blut, das mit PfCCp-Antiseren angereichert wird, Aufschluss darüber geben, ob PfCCp-Antikörper *in vivo* die Transmission von *P. falciparum* unterbinden können. Dabei soll durch Variation des Antiserengemisches die optimale Kombination und Konzentration der unterschiedlichen PfCCp-Antiseren ermittelt werden. Zusätzlich wäre es interessant, in weiteren Membranfütterungsexperimenten zu untersuchen, ob bei einer Mückenblutmahlzeit an PfCCp-KO-Parasiten eine Ergänzung mit den entsprechenden rekombinanten Proteinen die Transmission für PfCCp2- bzw. PfCCp3-KO-Parasiten in *Anopheles*-Mücken wiederhergestellt werden könnte.

Die in vorliegender Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien stützen die aufgestellte Hypothese, dass multiple Adhäsionsproteine während der Gamogonie einen Proteinkomplex ausbilden. Daher beinhalten weiterführende funktionelle Analysen *in vitro* die Charakterisierung der PfCCp-Interaktionen während der Sexualphase des Malariaerregers. Affinitätschromatographiestudien unter Verwendung einzelner rekombinanter Domänen sowie *yeast-two-hybrid*-Analysen könnten dabei zur eindeutigen Identifizierung der interagierenden PfCCp-Module führen. Ko-Immunpräzipitationsstudien an Gametozyten- und Gametenlysat sollen zusätzlich die Beteiligung weiterer sexualstadienspezifischer Proteine klären. MALDI-TOF-Analysen präzipitierter PfCCp-Interaktionspartner könnten in diesem Zusammenhang hilfreich sein, beteiligte Proteine antikörperunabhängig zu ermitteln. Weitere Experimente mittels Affinitätschromatographie und Ko-Immunpräzipitation dienen in unserem Labor aktuell dazu, die mögliche Bindung von Komplementfaktoren an PfCCp-Proteine zu untersuchen. Dies ist vor allem im Hinblick auf Immunevasionsmechanismen durch Plasmodien von Bedeutung. Von besonderem Interesse ist an dieser Stelle Faktor H, der durch seine Bindung an Oberflächenmoleküle Zellen vor einem Angriff des Komplementsystems schützen kann.

Ob die Interaktion rekombinanter PfCCp-Proteine mit Makrogameten, wie sie in dieser Arbeit durch Zelladhäsionsstudien gezeigt wurde, eine Signalkaskade initiiert, könnte durch die Messung des intrazellulären Kalziumspiegels von WT- bzw. PfCCp2- und PfCCp3-KO-Makrogameten nach Bindung rekombinanter Proteine untersucht werden. Da in der Regel ein Kalziumanstieg als Indikator einer Signalkaskadenaktivierung gilt, könnten Variationen zwischen WT- und KO-Parasiten auf eine PfCCp-vermittelte Induktion hindeuten. In diesem

Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant zu analysieren, ob die Bindungsaffinität der rekombinanten *PfCCp*-Proteine zwischen WT- und *PfCCp2*- bzw. *PfCCp3*-KO-Makrogameten variiert. Zusätzlich könnten rekombinante *PfCCp*-Proteine, die den Prozessierungsprodukten von *PfCCp1* und *PfCCp3* während der Gametogenese entsprechen, auf ihr Bindungsvermögen an Makrogameten untersucht werden; eine höhere Bindungsaffinität wäre denkbar. Zuvor müssten jedoch die Spaltstellen innerhalb der beiden *PfCCp*-Proteine identifiziert werden, um eine entsprechende Klonierung rekombinanter *PfCCp*-Konstrukte zu ermöglichen. Bioinformatische Analysen könnten durch den Abgleich der *PfCCp*-Sequenzen mit gängigen Prozessierungsmotiven hierbei Abhilfe schaffen.

Insgesamt stehen somit zwei Aspekte im Fokus der aktuellen und zukünftigen Forschung. Einerseits liegt ein Schwerpunkt auf der Evaluierung des *PfCCp*-Potentials in transmissionsblockierenden Experimenten. Andererseits nimmt die Analyse der molekularen *PfCCp*-Wechselwirkungen eine zentrale Rolle ein, um die Funktion dieser Proteine bei der Regulation der Sexualphase zu verstehen und Licht in die komplexen Vorgänge des *P. falciparum*-Lebenszyklus zu bringen, der zu den kompliziertesten unter den Parasiten zählt.

6 Zusammenfassung

Trotz intensiver Forschung und des *Global-Eradication-of-Malaria*-Programms der WHO in den 1950er Jahren zählt Malaria neben AIDS und Tuberkulose auch heute immer noch zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Aufgrund rasch zunehmender Resistenzentwicklung der Erreger gegen gängige Prophylaxe- sowie Therapiepräparate und dem Fehlen eines Impfstoffs sterben jährlich bis zu drei Millionen Menschen an Malaria. Seit vor etwa zwei Jahrzehnten das wissenschaftliche Interesse an transmissionsblockierenden Vakzinen gegen den Malariaerreger erwachte, rückten sexualstadienspezifische Oberflächenproteine in den Fokus der Impfstoffforschung. Dabei gelten besonders Proteine mit Adhäsionsdomänen, die an Parasit-Parasit- oder Parasit-Wirts-Interaktionen beteiligt sein könnten, als viel versprechende Kandidaten für Komponenten transmissionsblockierender Vakzine. Im Zuge der vollständigen Sequenzierung des *P. falciparum*-Genoms wurde bei dem *Screenen* nach Genen, die multiple tier- oder bakterienähnliche, adhäsive, extrazelluläre Domänen kodieren, die PfCCp-Familie identifiziert. Ihre sechs Mitglieder besitzen eine bemerkenswerte Vielfalt an hoch konservierten, adhäsiven Modulen, die eine Beteiligung an Protein-Protein-, Protein-Polysaccharid- oder Protein-Lipid-Interaktionen vermuten lassen. Die Multiadhäsionsdomänenproteine wurden aufgrund des gemeinsamen LCCL-Moduls PfCCp1 bis PfCCp5 benannt. Dem sechsten Mitglied, PfFNPA, fehlt zwar die namensgebende Domäne, doch die ausgeprägte Ähnlichkeit zu PfCCp5 führte zur Integration des Proteins in die PfCCp-Familie.

Die Charakterisierung der ersten drei Mitglieder zeigte, dass PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 sexualstadienspezifisch exprimiert werden und in der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten lokalisiert sind. Immunfluoreszenzstudien ließen außerdem erkennen, dass die Proteine während der Gametenbildung partiell freigesetzt werden und in einer matrixähnlichen Struktur Exflagellationszentren umgeben. In *Knockout*-Studien erwiesen sich PfCCp2 und PfCCp3 zusätzlich als essentielle Faktoren für die Migration reifer Sporoziten aus den Mitteldarmoozysten in die Speicheldrüsen der Mücken. Damit erfüllen sie die zwei grundlegenden Kriterien für Komponenten transmissionsblockierender Vakzine: eine sexualstadienspezifische Expression und essentielle Funktion während der Parasitenentwicklung in der Mücke. Aufgrund dieser viel versprechenden Daten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Analyse der PfCCp-Familie durch funktionale Charakterisierung von PfCCp4 sowie Interaktionsstudien an den PfCCp-Proteinen fortgesetzt.

Die Expressionsanalysen mittels RT-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenzstudien ergaben für PfCCp4 ebenfalls eine sexualstadienspezifische, Plasmamembran-assoziierte Expression innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten. Die Expression beginnt bereits in Gametozyten des Stadium I und erfolgt hauptsächlich in Makrogameto-

zyten. Im Gegensatz zu *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* wird *PfCCp4* jedoch homogen verteilt exprimiert. Während der Gametogenese wird *PfCCp4* nicht freigesetzt, sondern verbleibt an der Oberfläche von Makrogameten. Es ist zudem das einzige Mitglied der *PfCCp*-Familie, dessen Expression im Zuge der Ookinetenreifung wieder aufgenommen wird. *Knockout*-Studien durch Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken lassen allerdings darauf schließen, dass *PfCCp4* keine essentielle Funktion bei der Parasitenentwicklung ausübt. Der Verlust von *PfCCp4* beeinträchtigte weder die Fertilisation noch die Bildung, Reifung oder Migration von Ookineten, Oozysten oder Sporoziten. *PfCCp4* kann somit nicht als Kandidat transmissionsblockierender Vakzine betrachtet werden, obwohl es mit den viel versprechenden Kandidaten *Pfs230* und *Pfs48/45* interagiert, wie funktionelle Analysen nativer *PfCCp*-Proteine mittels Ko-Immünpräzipitation ergaben.

Weitere Ko-Immünpräzipitationsstudien identifizierten Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der *PfCCp*-Familie, wie bereits die Ko-Lokalisation und ko-abhängige Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*, ihre Freisetzung bei der Gametogenese und die matrixähnliche Verteilung um Exflagellationszentren vermuten ließen. In Affinitätschromatographiestudien unter Verwendung rekombinanter *PfCCp*-Proteine konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um direkte Interaktionen handelt, an denen besonders die LCCL- und die SR-Domäne beteiligt zu sein scheinen. In Zelladhäsionsstudien konnte außerdem eine Bindungsaffinität ausgewählter rekombinanter *PfCCp*-Proteine an Makrogameten beobachtet werden. Insgesamt bestätigen diese Daten unsere Hypothese, dass *PfCCp*-Proteine unter Beteiligung weiterer sexualstadienspezifischer Proteine während der Gametozytenreifung und Gametogenese Proteinkomplexe ausbilden. In zukünftigen Studien gilt es einerseits, ausgewählte *PfCCp*-Proteine durch transmissionsblockierende Experimente in ihrem Potential als Impfstoffkomponenten zu evaluieren. Andererseits nimmt die funktionale Charakterisierung der Proteinkomplexe während der Gamogonie eine zentrale Rolle ein, um ihre Funktion in der Sexualphase von *P. falciparum* zu klären und die Beteiligung der *PfCCp*-Proteine an der Regulation dieses komplexen Lebenszyklus zu verstehen.

7 Summary

Despite intense research and the global eradication of malaria program of the WHO in the 1950's, malaria is among AIDS and tuberculosis still one of the major infectious diseases worldwide. Rapidly increasing resistance of the pathogen against common treatment, and the persistent lack of a vaccine against malaria lead to a death toll of up to three million people annually. Since the scientific interest in transmission blocking strategies against *P. falciparum* awoke two decades ago, sexual stage-specific surface proteins became an important focus of antimalarial vaccine research. Especially, proteins containing multiple adhesion domains are regarded as promising candidates for subunits of transmission blocking vaccines due to their possible involvement in parasite-parasite or parasite-host interactions. Following the completion of the *P. falciparum* genome sequence and its screening for multiple animal- or bacterial-like, extracellular adhesion domains, the PfCCp protein family had been identified. It consists of six members with a striking variety of highly conserved adhesive modules, which were predicted to be involved in protein-protein, protein-polysaccharide or protein-lipid binding. These multidomain adhesion proteins were named PfCCp1 through PfCCp5 due to their common LCCL-domain. Though PfFNPA, the sixth member, lacks this domain, its strong similarity to the PfCCp5 architecture warranted its integration into the PfCCp family.

The characterization of the first three family members showed, that PfCCp1, PfCCp2 and PfCCp3 are specifically expressed within the parasitophorous vacuole of mature gametocytes. Studies via immunofluorescence assays revealed, that they are partly released during emergence and surround exflagellation centers extracellularly in a matrix-like pattern. Moreover, PfCCp2 and PfCCp3 were shown in knockout experiments to be essential for the transition of sporozoites from the midgut oocysts to the salivary glands of the mosquito. Thus, they fulfil two basic criteria for prospective components of transmission blocking vaccines: sexual stage-specific expression and an essential role for the parasite development within the mosquito. Based upon this promising data the present thesis dealt with further analyses of the PfCCp family via functional characterization of PfCCp4 and interaction studies of the PfCCp proteins.

The expression analysis of PfCCp4 using RT-PCR, Western Blot and immunofluorescence assays showed that it is also expressed in association with the plasma membrane within the parasitophorous vacuole of mature gametocytes. Expression starts as early as stage I of gametocytogenesis and is mainly restricted to macrogametocytes. In contrast to PfCCp1, PfCCp2 and PfCCp3, PfCCp4 is not expressed in a punctuated pattern but is distributed homogeneously, and instead of being released during emergence it remains on the surface of macrogametes. In addition, PfCCp4 is the only PfCCp member that resumes expression

during ookinete maturation. Knockout experiments revealed in membrane feedings of *Anopheles* mosquitoes that *PfCCp4* plays no essential role in the parasite development. The lack of *PfCCp4* neither affected fertilization nor formation, maturation or migration of ookinetes, oocysts or sporozoites. Thus, *PfCCp4* does not display any potential as a candidate for transmission blocking vaccines, though it interacts with the promising candidates *Pfs230* and *Pfs48/45*, as functional characterizations of native *PfCCp* proteins showed via co-immunoprecipitation assays.

Further co-immunoprecipitation experiments revealed protein-protein interactions within the *PfCCp* family, as the co-localization data had suggested, supported by the co-dependent expression of *PfCCp1*, *PfCCp2* and *PfCCp3*, their release during emergence and their matrix-like surrounding of exflagellation centers. Affinitychromatography studies on recombinant *PfCCp* proteins demonstrated, that these interactions are direct interactions, which appear to be mediated predominantly by the LCCL- and SR-domains. Cell adhesion assays revealed in addition a prominent binding affinity of select recombinant *PfCCp* proteins to macrogametes.

Taken together, this data support our hypothesis of protein complex formation mediated by the members of the *PfCCp* family and other sexual stage-specific proteins during the sexual development of *P. falciparum*. Future studies aim on one hand at the evaluation of the potential of select *PfCCp* proteins as vaccine subunits by transmission blocking assays. On the other hand, another focus will be the characterization of the proposed protein complexes to gain deeper insight into their function during sexual development, and to understand the role of the *PfCCp* proteins in the regulation of the intricate life cycle of the human malaria pathogen *P. falciparum*.

8 Literaturverzeichnis

Aide, P., Bassat, Q. und Alonso, P. L. (2007). Towards an effective malaria vaccine. *Arch Dis Child* **92**, 476-479.

Alano, P. (2007). Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol* **66**, 291-302.

Alano, P. und Billker, O. (2005). Gametocytes and gametes. In: Sherman, I. W. (Ed.), Molecular approaches to malaria. *ASM Press*, Washington S. 191-219.

Alano, P., Premawansa, S., Bruce, M. C. und Carter, R. (1991). A stage specific gene expressed at the onset of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **46**, 81-88.

Alano, P., Read, D., Bruce, M., Aikawa, M., Kaido, T., Tegoshi, T., Bhatti, S., Smith, D. K., Luo, C., Hansra, S. et al. (1995). COS cell expression cloning of Pfg377, a Plasmodium falciparum gametocyte antigen associated with osmiophilic bodies. *Mol Biochem Parasitol* **74**, 143-156.

Alonso, P. L., Sacarlal, J., Aponte, J. J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., Mandomando, I., Spiessens, B., Guinovart, C., Espasa, M. et al. (2004). Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* **364**, 1411-1420.

Angus, B. J., Chotivanich, K., Udomsangpetch, R. und White, N. J. (1997). In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria. *Blood* **90**, 2037-2040.

Arai, M., Billker, O., Morris, H. R., Panico, M., Delcroix, M., Dixon, D., Ley, S. V. und Sinden, R. E. (2001). Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of Plasmodium in the midgut of the mosquito. *Mol Biochem Parasitol* **116**, 17-24.

Arakawa, T., Komesu, A., Otsuki, H., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R., Matsumoto, Y., Tsuji, N., Wu, Y., Torii, M. und Tsuboi, T. (2005). Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of Plasmodium falciparum. *Infect Immun* **73**, 7375-7380.

Aruffo, A., Bowen, M. A., Patel, D. D., Haynes, B. F., Starling, G. C., Gebe, J. A. und Bajorath, J. (1997). CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* **18**, 498-504.

Baker, D. A., Daramola, O., McCrossan, M. V., Harmer, J. und Targett, G. A. (1994). Subcellular localization of Pfs16, a Plasmodium falciparum gametocyte antigen. *Parasitology* **108** (Bd. 2), 129-137.

Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S. und Mitchell, G. H. (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitol Today* **16**, 427-433.

- Barnes, D. A., Thompson, J., Triglia, T., Day, K. und Kemp, D. J.** (1994). Mapping the genetic locus implicated in cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to melanoma cells. *Mol Biochem Parasitol* **66**, 21-29.
- Bateman, A. und Sandford, R.** (1999). The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr Biol* **9**, R588-590.
- Baumgartner, S., Hofmann, K., Chiquet-Ehrismann, R. und Bucher, P.** (1998). The discoidin domain family revisited: new members from prokaryotes and a homology-based fold prediction. *Protein Sci* **7**, 1626-1631.
- Bharadwaj, D., Mold, C., Markham, E. und Du Clos, T. W.** (2001). Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* **166**, 6735-6741.
- Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G. und Sinden, R. E.** (1997). The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology* **115 (Bd. 1)**, 1-7.
- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R. E. und Morris, H. R.** (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**, 289-292.
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B. und Brinkmann, V.** (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* **117**, 503-514.
- Blumbach, B., Pancer, Z., Diehl-Seifert, B., Steffen, R., Munkner, J., Muller, I. und Muller, W. E.** (1998). The putative sponge aggregation receptor. Isolation and characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats. *J Cell Sci* **111 (Bd. 17)**, 2635-2644.
- Bohle, D. S., Dinnebier, R. E., Madsen, S. K. und Stephens, P. W.** (1997). Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. *J Biol Chem* **272**, 713-716.
- Brooks, S. R. und Williamson, K. C.** (2000). Proteolysis of *Plasmodium falciparum* surface antigen, Pfs230, during gametogenesis. *Mol Biochem Parasitol* **106**, 77-82.
- Bruce, M. C., Alano, P., Duthie, S. und Carter, R.** (1990). Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* **100 (Bd. 2)**, 191-200.
- Bruce, M. C., Carter, R. N., Nakamura, K., Aikawa, M. und Carter, R.** (1994). Cellular location and temporal expression of the *Plasmodium falciparum* sexual stage antigen Pfs16. *Mol Biochem Parasitol* **65**, 11-22.
- Bustamante, P. J., Woodruff, D. C., Oh, J., Keister, D. B., Muratova, O. und Williamson, K. C.** (2000). Differential ability of specific regions of *Plasmodium falciparum* sexual-stage antigen, Pfs230, to induce malaria transmission-blocking immunity. *Parasite Immunol* **22**, 373-380.

- Carlton, J. M., Angiuoli, S. V., Suh, B. B., Kooij, T. W., Perte, M., Silva, J. C., Ermolaeva, M. D., Allen, J. E., Selengut, J. D., Koo, H. L. et al.** (2002). Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* **419**, 512-519.
- Carter, R.** (2001). Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* **19**, 2309-2314.
- Carter, R., Mendis, K. N., Miller, L. H., Molineaux, L. und Saul, A.** (2000). Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med* **6**, 241-244.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Dondorp, A., Williams, T., Angus, B., Simpson, J. A., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S., Newbold, C. I. und White, N. J.** (2000). The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* **182**, 629-633.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., McGready, R., Proux, S., Newton, P., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S. und White, N. J.** (2002). Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *J Infect Dis* **185**, 1538-1541.
- Claudianos, C., Dessens, J. T., Trueman, H. E., Arai, M., Mendoza, J., Butcher, G. A., Crompton, T. und Sinden, R. E.** (2002). A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development. *Mol Microbiol* **45**, 1473-1484.
- Clements, A.N.** (1992). *The Biology of Mosquitoes*, Chapman & Hall, London, New York.
- Collins, W. E., Anders, R. F., Ruebush, T. K., 2nd, Kemp, D. J., Woodrow, G. C., Campbell, G. H., Brown, G. V., Irving, D. O., Goss, N., Filipski, V. K. et al.** (1991). Immunization of owl monkeys with the ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **44**, 34-41.
- Colombatti, A. und Bonaldo, P.** (1991). The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* **77**, 2305-2315.
- Colombatti, A., Bonaldo, P. und Doliana, R.** (1993). Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix* **13**, 297-306.
- Cowman, A. F. und Crabb, B. S.** (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**, 755-766.
- Creasey, A., Mendis, K., Carlton, J., Williamson, D., Wilson, I. und Carter, R.** (1994). Maternal inheritance of extrachromosomal DNA in malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* **65**, 95-98.
- Day, K. P., Karamalis, F., Thompson, J., Barnes, D. A., Peterson, C., Brown, H., Brown, G. V. und Kemp, D. J.** (1993). Genes necessary for expression of a virulence determinant and for transmission of *Plasmodium falciparum* are located on a 0.3-megabase region of chromosome 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8292-8296.

- Delrieu, I., Waller, C. C., Mota, M. M., Grainger, M., Langhorne, J. und Holder, A. A.** (2002). PSLAP, a protein with multiple adhesive motifs, is expressed in Plasmodium falciparum gametocytes. *Mol Biochem Parasitol* **121**, 11-20.
- Dessens, J. T., Sinden, R. E. und Claudianos, C.** (2004). LCCL proteins of apicomplexan parasites. *Trends Parasitol* **20**, 102-108.
- Dessens, J. T., Beetsma, A. L., Dimopoulos, G., Wengelnik, K., Crisanti, A., Kafatos, F. C. und Sinden, R. E.** (1999). CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *EMBO J* **18**, 6221-6227.
- Dessens, J. T., Mendoza, J., Claudianos, C., Vinetz, J. M., Khater, E., Hassard, S., Ranawaka, G. R. und Sinden, R. E.** (2001). Knockout of the rodent malaria parasite chitinase pbCHT1 reduces infectivity to mosquitoes. *Infect Immun* **69**, 4041-4047.
- Dessens, J. T., Siden-Kiamos, I., Mendoza, J., Mahairaki, V., Khater, E., Vlachou, D., Xu, X. J., Kafatos, F. C., Louis, C., Dimopoulos, G. et al.** (2003). SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Mol Microbiol* **49**, 319-329.
- Dorin, D., Alano, P., Boccaccio, I., Ciceron, L., Doerig, C., Sulpice, R. und Parzy, D.** (1999). An atypical mitogen-activated protein kinase (MAPK) homologue expressed in gametocytes of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Identification of a MAPK signature. *J Biol Chem* **274**, 29912-29920.
- Dorin, D., Le Roch, K., Sallicandro, P., Alano, P., Parzy, D., Poulet, P., Meijer, L. und Doerig, C.** (2001). Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. *Eur J Biochem* **268**, 2600-2608.
- Dovi, E.** (2006). Ghana's Malaria Problem gets Boost from Vaccine Trials. *VOA News*, 10 October 2006.
- Duffy, P. E. und Kaslow, D. C.** (1997). A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infect Immun* **65**, 1109-1113.
- Duraisingh, M. T., Triglia, T. Und Cowman, A. F.** (2002). Negative selection of Plasmodium falciparum reveals targeted gene deletion by double crossover recombination. *Int J Parasitol* **32**, 81-89.
- Dyer, M. und Day, K. P.** (2003). Regulation of the rate of asexual growth and commitment to sexual development by diffusible factors from in vitro cultures of Plasmodium falciparum. *Am J Trop Med Hyg* **68**, 403-409.
- Ecker, A., Pinto, S. B., Baker, K. W., Kafatos, F. C. und Sinden, R. E.** (2007). Plasmodium berghei: plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in Anopheles stephensi. *Exp Parasitol* **116**, 504-508.

- Eksi, S. und Williamson, K. C.** (2002). Male-specific expression of the paralog of malaria transmission-blocking target antigen Pfs230, PfB0400w. *Mol Biochem Parasitol* **122**, 127-130.
- Eksi, S., Czesny, B., Greenbaum, D. C., Bogyo, M. und Williamson, K. C.** (2004). Targeted disruption of Plasmodium falciparum cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth. *Mol Microbiol* **53**, 243-250.
- Eksi, S., Czesny, B., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Eling, W. und Williamson, K. C.** (2006). Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Mol Microbiol* **61**, 991-998.
- Elomaa, O., Sankala, M., Pikkarainen, T., Bergmann, U., Tuuttila, A., Raatikainen-Ahokas, A., Sariola, H. und Tryggvason, K.** (1998). Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *J Biol Chem* **273**, 4530-4538.
- Etlinger, H. M., Caspers, P., Matile, H., Schoenfeld, H. J., Stueber, D. und Takacs, B.** (1991). Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with Plasmodium falciparum. *Infect Immun* **59**, 3498-3503.
- Fanning, S. L., Czesny, B., Sedegah, M., Carucci, D. J., van Gemert, G. J., Eling, W. und Williamson, K. C.** (2003). A glycosylphosphatidylinositol anchor signal sequence enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding Plasmodium falciparum sexual-stage antigen, Pfs230. *Vaccine* **21**, 3228-3235.
- Ferreira, I. D., Lopes, D., Martinelli, A., Ferreira, C., do Rosario, V. E. und Cravo, P.** (2007). In vitro assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of Plasmodium falciparum from Sao Tome and Principe. *Trop Med Int Health* **12**, 353-362.
- Fries, H. C., Lamers, M. B., van Deursen, J., Ponnudurai, T. und Meuwissen, J. H.** (1990). Biosynthesis of the 25-kDa protein in the macrogametes/zygotes of Plasmodium falciparum. *Exp Parasitol* **71**, 229-235.
- Garcia, G. E., Wirtz, R. A., Barr, J. R., Woolfitt, A. und Rosenberg, R.** (1998). Xanthurenic acid induces gametogenesis in Plasmodium, the malaria parasite. *J Biol Chem* **273**, 12003-12005.
- Gardner, M. J., Shallom, S. J., Carlton, J. M., Salzberg, S. L., Nene, V., Shoaibi, A., Ciecko, A., Lynn, J., Rizzo, M., Weaver, B. et al.** (2002). Sequence of Plasmodium falciparum chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* **419**, 531-534.
- Genton, B., Betuela, I., Felger, I., Al-Yaman, F., Anders, R. F., Saul, A., Rare, L., Baisor, M., Lorry, K., Brown, G. V. et al.** (2002). A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces Plasmodium falciparum density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis* **185**, 820-827.

- Genton, B., Al-Yaman, F., Betuela, I., Anders, R. F., Saul, A., Baea, K., Mellombo, M., Taraika, J., Brown, G. V., Pye, D. et al.** (2003). Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. *Vaccine* **22**, 30-41.
- Gilbert, S. C., Plebanski, M., Gupta, S., Morris, J., Cox, M., Aidoo, M., Kwiatkowski, D., Greenwood, B. M., Whittle, H. C. und Hill, A. V.** (1998). Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. *Science* **279**, 1173-1177.
- Goldberger, G., Bruns, G. A., Rits, M., Edge, M. D. und Kwiatkowski, D. J.** (1987). Human complement factor I: analysis of cDNA-derived primary structure and assignment of its gene to chromosome 4. *J Biol Chem* **262**, 10065-10071.
- Goodman, C. D. und McFadden, G. I.** (2007). Fatty acid biosynthesis as a drug target in apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets* **8**, 15-30.
- Goodyer, I. D. und Taraschi, T. F.** (1997). *Plasmodium falciparum*: a simple, rapid method for detecting parasite clones in microtiter plates. *Exp Parasitol* **86**, 158-160.
- Greenwood, B. und Mutabingwa, T.** (2002). Malaria in 2002. *Nature* **415**, 670-672.
- Griffith, K. S., Lewis, L. S., Mali, S. und Parise, M. E.** (2007). Treatment of malaria in the United States: a systematic review. *JAMA* **297**, 2264-2277.
- Hall, N., Karras, M., Raine, J. D., Carlton, J. M., Kooij, T. W., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C. S., Pain, A., Christophides, G. K. et al.** (2005). A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* **307**, 82-86.
- Hausmann und Hülsmann** (1996). Protozoology, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Healer, J., McGuinness, D., Hopcroft, P., Haley, S., Carter, R. und Riley, E.** (1997). Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230. *Infect Immun* **65**, 3017-3023.
- Hepner, D. G., Jr., Kester, K. E., Ockenhouse, C. F., Tornieporth, N., Ofori, O., Lyon, J. A., Stewart, V. A., Dubois, P., Lanar, D. E., Krzych, U. et al.** (2005). Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* **23**, 2243-2250.
- Hisaeda, H., Saul, A., Reece, J. J., Kennedy, M. C., Long, C. A., Miller, L. H. und Stowers, A. W.** (2002). Merozoite surface protein 3 and protection against malaria in *Aotus nancymai* monkeys. *J Infect Dis* **185**, 657-664.
- Hodder, A. N., Crewther, P. E., Matthew, M. L., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. und Anders, R. F.** (1996). The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* **271**, 29446-29452.

- Hoffman, S. L., Goh, L. M., Luke, T. C., Schneider, I., Le, T. P., Doolan, D. L., Sacci, J., de la Vega, P., Dowler, M., Paul, C. et al.** (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* **185**, 1155-1164.
- Hornebeck, W., Bellon, G. und Emonard, H.** (2005). Fibronectin type II (FnII)-like modules regulate gelatinase A activity. *Pathol Biol (Paris)* **53**, 405-410.
- Ishino, T., Orito, Y., Chinzei, Y. und Yuda, M.** (2006). A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol Microbiol* **59**, 1175-1184.
- Janse, C. J., van der Klooster, P. F., van der Kaay, H. J., van der Ploeg, M. und Overdulve, J. P.** (1986). DNA synthesis in *Plasmodium berghei* during asexual and sexual development. *Mol Biochem Parasitol* **20**, 173-182.
- Janse, C. J., Ponnudurai, T., Lensen, A. H., Meuwissen, J. H., Ramesar, J., Van der Ploeg, M. und Overdulve, J. P.** (1988). DNA synthesis in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* **96** (Bd. 1), 1-7.
- Joy, D. A., Feng, X., Mu, J., Furuya, T., Chotivanich, K., Krettli, A. U., Ho, M., Wang, A., White, N. J., Suh, E. et al.** (2003). Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science* **300**, 318-321.
- Kadota, K., Ishino, T., Matsuyama, T., Chinzei, Y. und Yuda, M.** (2004). Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16310-16315.
- Kaplan, F., Ledoux, P., Kassamali, F. Q., Gagnon, S., Post, M., Koehler, D., Deimling, J. und Swezey, N. B.** (1999). A novel developmentally regulated gene in lung mesenchyme: homology to a tumor-derived trypsin inhibitor. *Am J Physiol* **276**, L1027-1036.
- Kaslow, D. C.** (1997). Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int J Parasitol* **27**, 183-189.
- Kaslow, D. C.** (2002). Transmission-blocking vaccines. *Chem Immunol* **80**, 287-307.
- Kaslow, D. C. und Shiloach, J.** (1994). Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission-blocking vaccine candidate: TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose. *Biotechnology (N Y)* **12**, 494-499.
- Kaslow, D. C., Quakyi, I. A., Syin, C., Raum, M. G., Keister, D. B., Coligan, J. E., McCutchan, T. F. und Miller, L. H.** (1988). A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**, 74-76.
- Kawamoto, F., Alejo-Blanco, R., Fleck, S. L., Kawamoto, Y. und Sinden, R. E.** (1990). Possible roles of Ca²⁺ and cGMP as mediators of the exflagellation of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **42**, 101-108.

- Kawamoto, F., Fujioka, H., Murakami, R., Syafruddin, Hagiwara, M., Ishikawa, T. und Hidaka, H.** (1993). The roles of Ca²⁺/calmodulin- and cGMP-dependent pathways in gametogenesis of a rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *Eur J Cell Biol* **60**, 101-107.
- Khan, S. M., Franke-Fayard, B., Mair, G. R., Lasonder, E., Janse, C. J., Mann, M. und Waters, A. P.** (2005). Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell* **121**, 675-687.
- Kjeldsen, L., Cowland, J. B., Johnsen, A. H. und Borregaard, N.** (1996). SGP28, a novel matrix glycoprotein in specific granules of human neutrophils with similarity to a human testis-specific gene product and a rodent sperm-coating glycoprotein. *FEBS Lett* **380**, 246-250.
- Kobayashi, T., Sato, S., Takamiya, S., Komaki-Yasuda, K., Yano, K., Hirata, A., Onitsuka, I., Hata, M., Mi-ichi, F., Tanaka, T. et al.** (2007). Mitochondria and apicoplast of *Plasmodium falciparum*: behaviour on subcellular fractionation and the implication. *Mitochondrion* **7**, 125-132.
- Kocken, C. H., Jansen, J., Kaan, A. M., Beckers, P. J., Ponnudurai, T., Kaslow, D. C., Konings, R. N. und Schoenmakers, J. G.** (1993). Cloning and expression of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **61**, 59-68.
- Komisar, J. L.** (2007). Malaria vaccines. *Front Biosci* **12**, 3928-3955.
- Kongkasuriyachai, D., Fujioka, H. und Kumar, N.** (2004). Functional analysis of *Plasmodium falciparum* parasitophorous vacuole membrane protein (Pfs16) during gametocytogenesis and gametogenesis by targeted gene disruption. *Mol Biochem Parasitol* **133**, 275-285.
- Koshiba, T. und Chan, D. C.** (2003). The prefusogenic intermediate of HIV-1 gp41 contains exposed C-peptide regions. *J Biol Chem* **278**, 7573-7579.
- Kumar, N.** (1987). Target antigens of malaria transmission blocking immunity exist as a stable membrane bound complex. *Parasite Immunol* **9**, 321-335.
- Kumar, N.** (1997). Protein phosphorylation during sexual differentiation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **87**, 205-210.
- Kumar, N. und Wize, B.** (1992). Further characterization of interactions between gamete surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **53**, 113-120.
- Lanfrancotti, A., Bertuccini, L., Silvestrini, F. und Alano, P.** (2007). *Plasmodium falciparum*: mRNA co-expression and protein co-localisation of two gene products upregulated in early gametocytes. *Exp Parasitol* **116**, 497-503.
- Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J. S., Vermunt, A. M., Pain, A., Sauerwein, R. W., Eling, W. M., Hall, N., Waters, A. P., Stunnenberg, H. G. et al.** (2002). Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature* **419**, 537-542.

- Le Bras, J. und Durand, R.** (2003). The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* **17**, 147-153.
- Li, F., Templeton, T. J., Popov, V., Comer, J. E., Tsuboi, T., Torii, M. und Vinetz, J. M.** (2004). *Plasmodium* ookinete-secreted proteins secreted through a common micronemal pathway are targets of blocking malaria transmission. *J Biol Chem* **279**, 26635-26644.
- Li, F., Patra, K. P. und Vinetz, J. M.** (2005). An anti-Chitinase malaria transmission-blocking single-chain antibody as an effector molecule for creating a *Plasmodium falciparum*-refractory mosquito. *J Infect Dis* **192**, 878-887.
- Liepinsh, E., Trexler, M., Kaikkonen, A., Weigelt, J., Banyai, L., Patthy, L. und Otting, G.** (2001). NMR structure of the LCCL domain and implications for DFNA9 deafness disorder. *EMBO J* **20**, 5347-5353.
- Lingnau, A., Margos, G., Maier, W. A. und Seitz, H. M.** (1993). The effects of hormones on the gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Appl Parasitol* **34**, 153-160.
- Lobo, C. A., Konings, R. N. und Kumar, N.** (1994). Expression of early gametocyte-stage antigens Pfg27 and Pfs16 in synchronized gametocytes and non-gametocyte producing clones of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **68**, 151-154.
- Loscher, T., Hoelscher, M. und Nothdurft, H. D.** (2003). [Malaria-treatment]. *Dtsch Med Wochenschr* **128**, 1294-1296.
- Lye, Y. M., Chan, M. und Sim, T. S.** (2006). Pfnek3: an atypical activator of a MAP kinase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett* **580**, 6083-6092.
- Mair, G. R., Braks, J. A., Garver, L. S., Wiegant, J. C., Hall, N., Dirks, R. W., Khan, S. M., Dimopoulos, G., Janse, C. J. und Waters, A. P.** (2006). Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science* **313**, 667-669.
- Malkin, E. M., Diemert, D. J., McArthur, J. H., Perreault, J. R., Miles, A. P., Giersing, B. K., Mullen, G. E., Orcutt, A., Muratova, O., Awkal, M. et al.** (2005a). Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* **73**, 3677-3685.
- Malkin, E. M., Durbin, A. P., Diemert, D. J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, K., Long, C. A., Lambert, L., Miles, A. P., Wang, J. et al.** (2005b). Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* **23**, 3131-3138.
- Marsh, K.** (1999). Clinical Features of Malaria, In: M. Wahlgreen, P. Perlmann (Eds.), *Malaria-Molecular and Clinical Aspects*, Harwood Academic Publishers, 1999, S. 87-118.
- Marshall, V. M., Zhang, L., Anders, R. F. und Coppel, R. L.** (1996). Diversity of the vaccine candidate AMA-1 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **77**, 109-113.

- Martin, S. K., Jett, M. und Schneider, I.** (1994). Correlation of phosphoinositide hydrolysis with exflagellation in the malaria microgametocyte. *J Parasitol* **80**, 371-378.
- Mehlhorn, H.** (1998). Grundriss der Parasitenkunde, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 5. Auflage 52-60.
- Menendez, C., Ordi, J., Ismail, M. R., Ventura, P. J., Aponte, J. J., Kahigwa, E., Font, F. und Alonso, P. L.** (2000). The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* **181**, 1740-1745.
- Moelans, I. I., Meis, J. F., Kocken, C., Konings, R. N. und Schoenmakers, J. G.** (1991). A novel protein antigen of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, located on the surface of gametes and sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* **45**, 193-204.
- Motard, A., Landau, I., Nussler, A., Grau, G., Baccam, D., Mazier, D. und Targett, G. A.** (1993). The role of reactive nitrogen intermediates in modulation of gametocyte infectivity of rodent malaria parasites. *Parasite Immunol* **15**, 21-26.
- Muller, W. E.** (1997). Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from cDNA analyses in the marine sponge *Geodia cydonium*: a review. *Cell Tissue Res* **289**, 383-395.
- Muta, T., Miyata, T., Misumi, Y., Tokunaga, F., Nakamura, T., Toh, Y., Ikehara, Y. und Iwanaga, S.** (1991). Limulus factor C. An endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. *J Biol Chem* **266**, 6554-65561.
- Nacher, M., Singhasivanon, P., Silachamroon, U., Treeprasertsuk, S., Tosukhowong, T., Vannaphan, S., Gay, F., Mazier, D. und Looareesuwan, S.** (2002). Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage. *J Parasitol* **88**, 97-101.
- Nakamura, T., Tokunaga, F., Morita, T. und Iwanaga, S.** (1988). Interaction between lipopolysaccharide and intracellular serine protease zymogen, factor C, from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes. *J Biochem (Tokyo)* **103**, 370-374.
- Narum, D. L. und Thomas, A. W.** (1994). Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* **67**, 59-68.
- Narum, D. L., Ogun, S. A., Thomas, A. W. und Holder, A. A.** (2000). Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. *Infect Immun* **68**, 2899-2906.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. und Mosinger, E.** (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol* **108**, 17-27.

- Nijhout, M. M. und Carter, R.** (1978). Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro. *Parasitology* **76**, 39-53.
- Ockenhouse, C. F., Angov, E., Kester, K. E., Diggs, C., Soisson, L., Cummings, J. F., Stewart, A. V., Palmer, D. R., Mahajan, B., Krzych, U. et al.** (2006). Phase I safety and immunogenicity trial of FMP1/AS02A, a Plasmodium falciparum MSP-1 asexual blood stage vaccine. *Vaccine* **24**, 3009-3017.
- Ogwan'g, R., Mwangi, J., Gachihi, G., Nwachukwu, A., Roberts, C. R. und Martin, S. K.** (1993). Use of pharmacological agents to implicate a role for phosphoinositide hydrolysis products in malaria gamete formation. *Biochem Pharmacol* **46**, 1601-1606.
- Outchkourov, N., Vermunt, A., Jansen, J., Kaan, A., Roeffen, W., Teelen, K., Lasonder, E., Braks, A., van de Vegte-Bolmer, M., Qiu, L. Y. et al.** (2007). Epitope analysis of the malaria surface antigen pfs48/45 identifies a subdomain that elicits transmission blocking antibodies. *J Biol Chem* **282**, 17148-17156.
- Pancer, Z.** (2000). Dynamic expression of multiple scavenger receptor cysteine-rich genes in coelomocytes of the purple sea urchin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13156-13161.
- Pangburn, M. K.** (2000). Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology* **49**, 149-157.
- Peterson, M. G., Marshall, V. M., Smythe, J. A., Crewther, P. E., Lew, A., Silva, A., Anders, R. F. und Kemp, D. J.** (1989). Integral membrane protein located in the apical complex of Plasmodium falciparum. *Mol Cell Biol* **9**, 3151-3154.
- Plebanski, M., Lee, E. A., Hannan, C. M., Flanagan, K. L., Gilbert, S. C., Gravenor, M. B. und Hill, A. V.** (1999). Altered peptide ligands narrow the repertoire of cellular immune responses by interfering with T-cell priming. *Nat Med* **5**, 565-571.
- Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A. D. und Meuwissen, J. H.** (1981). Chloroquine sensitivity of isolates of Plasmodium falciparum adapted to in vitro culture. *Trop Geogr Med* **33**, 50-54.
- Ponting, C. P. und Russell, R. B.** (2000). Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *J Mol Biol* **302**, 1041-1047.
- Pradel, G.** (2007). Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology* **134**, 1911-1929.
- Pradel, G., und Templeton, T. J.** (2006). Genomics of pathogenic parasites. In: Dobrindt, U., Hacker, J. H. (Eds.), Pathogenomics - Genome Analysis of Pathogenic Microbes. Wiley-VCH, Weinheim, S. 417-444.
- Pradel, G., Hayton, K., Aravind, L., Iyer, L. M., Abrahamsen, M. S., Bonawitz, A., Mejia, C. und Templeton, T. J.** (2004). A multidomain adhesion protein family expressed in Plasmodium falciparum is essential for transmission to the mosquito. *J Exp Med* **199**, 1533-1544.

- Pradel, G., Wagner, C., Mejia, C. und Templeton, T. J.** (2006). Plasmodium falciparum: Co-dependent expression and co-localization of the PfCCp multi-adhesion domain proteins. *Exp Parasitol* **112**, 263-268.
- Quakyi, I. A., Carter, R., Rener, J., Kumar, N., Good, M. F. und Miller, L. H.** (1987). The 230-kDa gamete surface protein of Plasmodium falciparum is also a target for transmission-blocking antibodies. *J Immunol* **139**, 4213-4217.
- Raine, J. D., Ecker, A., Mendoza, J., Tewari, R., Stanway, R. R. und Sinden, R. E.** (2007). Female inheritance of malarial lap genes is essential for mosquito transmission. *PLoS Pathog* **3**, e30.
- Rangarajan, R., Bei, A. K., Jethwaney, D., Maldonado, P., Dorin, D., Sultan, A. A. und Doerig, C.** (2005). A mitogen-activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite Plasmodium berghei. *EMBO Rep* **6**, 464-469.
- Rawlings, D. J., Fujioka, H., Fried, M., Keister, D. B., Aikawa, M. und Kaslow, D. C.** (1992). Alpha-tubulin II is a male-specific protein in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **56**, 239-250.
- Read, D., Lensen, A. H., Begarnie, S., Haley, S., Raza, A. und Carter, R.** (1994). Transmission-blocking antibodies against multiple, non-variant target epitopes of the Plasmodium falciparum gamete surface antigen Pfs230 are all complement-fixing. *Parasite Immunol* **16**, 511-519.
- Reed, M. B., Saliba, K. J., Caruana, S. R., Kirk, K. und Cowman, A. F.** (2000). Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in Plasmodium falciparum. *Nature* **403**, 906-909.
- Reininger, L., Billker, O., Tewari, R., Mukhopadhyay, A., Fennell, C., Dorin-Semblat, D., Doerig, C., Goldring, D., Harmse, L., Ranford-Cartwright, L. et al.** (2005). A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *J Biol Chem* **280**, 31957-31964.
- Rener, J., Graves, P. M., Carter, R., Williams, J. L. und Burkot, T. R.** (1983). Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of plasmodium falciparum. *J Exp Med* **158**, 976-981.
- Resnick, D., Pearson, A. und Krieger, M.** (1994). The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* **19**, 5-8.
- Richie, T. L. und Saul, A.** (2002). Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* **415**, 694-701.
- Robertson, N. G., Skvorak, A. B., Yin, Y., Weremowicz, S., Johnson, K. R., Kovatch, K. A., Battey, J. F., Bieber, F. R. und Morton, C. C.** (1997). Mapping and characterization of a novel cochlear gene in human and in mouse: a positional candidate gene for a deafness disorder, DFNA9. *Genomics* **46**, 345-354.
- Robertson, N. G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S. N., Eavey, R. D., McKenna, M., Nadol, J. B., Jr., Miyamoto, R. T., Linthicum, F. H., Jr., Lubianca Neto, J. F. et al.** (1998). Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* **20**, 299-303.

- Rogers, N. J., Hall, B. S., Obiero, J., Targett, G. A. und Sutherland, C. J.** (2000). A model for sequestration of the transmission stages of *Plasmodium falciparum*: adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. *Infect Immun* **68**, 3455-3462.
- Rosenberg, R., Wirtz, R. A., Schneider, I. und Burge, R.** (1990). An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**, 209-212.
- Rupp, I., Bosse, R., Schirmeister, T. und Pradel, G.** (2007). Effect of protease inhibitors on gamete formation in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, in Druck.
- Sachs, J. und Malaney, P.** (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature* **415**, 680-685.
- Sauerwein, R. W.** (2007). Malaria transmission-blocking vaccines: the bonus of effective malaria control. *Microbes Infect* **9**, 792-795.
- Saul, A.** (2007). Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. *Curr Opin Infect Dis* **20**, 476-481.
- Saute, F., Menendez, C., Mayor, A., Aponte, J., Gomez-Olive, X., Dgedge, M. und Alonso, P.** (2002). Malaria in pregnancy in rural Mozambique: the role of parity, submicroscopic and multiple *Plasmodium falciparum* infections. *Trop Med Int Health* **7**, 19-28.
- Scherf, A., Carter, R., Petersen, C., Alano, P., Nelson, R., Aikawa, M., Mattei, D., Pereira da Silva, L. und Leech, J.** (1992). Gene inactivation of Pf11-1 of *Plasmodium falciparum* by chromosome breakage and healing: identification of a gametocyte-specific protein with a potential role in gametogenesis. *EMBO J* **11**, 2293-2301.
- Schlitzer, M.** (2007). Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development. *ChemMedChem* **2**, 944-986.
- Schneweis, S., Maier, W. A. und Seitz, H. M.** (1991). Haemolysis of infected erythrocytes--a trigger for formation of *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Parasitol Res* **77**, 458-460.
- Scholz, S.M., Dude, M.-A. und Pradel, G.** (2005). Malaria – vom Genom zum Impfstoff. *Bioforum*, **28** (10), 71-73.
- Scholz, S. M., Simon, N., Lavazec, C., Dude, M. A., Templeton, T. J. und Pradel, G.** (2007). PfCCp proteins of *Plasmodium falciparum*: Gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *Int J Parasitol*, in Druck.
- Service, M. W.** (1993). Community participation in vector-borne disease control. *Ann Trop Med Parasitol* **87**, 223-234.
- Sharma, A., Sharma, I., Kogkasuriyachai, D. und Kumar, N.** (2003). Structure of a gametocyte protein essential for sexual development in *Plasmodium falciparum*. *Nat Struct Biol* **10**, 197-203.

- Siddiqui, W. A., Tam, L. Q., Kramer, K. J., Hui, G. S., Case, S. E., Yamaga, K. M., Chang, S. P., Chan, E. B. und Kan, S. C.** (1987). Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against Plasmodium falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3014-3018.
- Siden-Kiamos, I., Ecker, A., Nyback, S., Louis, C., Sinden, R. E. und Billker, O.** (2006). Plasmodium berghei calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol Microbiol* **60**, 1355-1363.
- Silvestrini, F., Alano, P. und Williams, J. L.** (2000). Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Parasitology* **121 (Bd. 5)**, 465-471.
- Silvestrini, F., Bozdech, Z., Lanfrancotti, A., Di Giulio, E., Bultrini, E., Picci, L., Derisi, J. L., Pizzi, E. und Alano, P.** (2005). Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **143**, 100-110.
- Sinden, R. E.** (1982). Gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro: an electron microscopic study. *Parasitology* **84**, 1-11.
- Sinden, R. E.** (1983). The cell biology of sexual development in plasmodium. *Parasitology* **86 (Bd. 4)**, 7-28.
- Sinden, R. E.** (1999). Plasmodium differentiation in the mosquito. *Parassitologia* **41**, 139-148.
- Sinden, R. E. und Hartley, R. H.** (1985). Identification of the meiotic division of malarial parasites. *J Protozool* **32**, 742-744.
- Sinden, R. E. und Billingsley, P. F.** (2001). Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol* **17**, 209-212.
- Sinden, R. E., Canning, E. U., Bray, R. S. und Smalley, M. E.** (1978). Gametocyte and gamete development in Plasmodium falciparum. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **201**, 375-399.
- Slater, A. F., Swiggard, W. J., Orton, B. R., Flitter, W. D., Goldberg, D. E., Cerami, A. und Henderson, G. B.** (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 325-329.
- Smalley, M. E., Abdalla, S. und Brown, J.** (1981). The distribution of Plasmodium falciparum in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **75**, 103-105.
- Smith, T., Felger, I., Tanner, M. und Beck, H. P.** (1999). Premunition in Plasmodium falciparum infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93 Suppl 1**, 59-64.
- Smith, T. G., Lourenco, P., Carter, R., Walliker, D. und Ranford-Cartwright, L. C.** (2000). Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Parasitology* **121 (Bd. 2)**, 127-133.

- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y. und Hay, S. I.** (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria, *Nature* **434**, 214–217.
- Stoute, J. A., Gombe, J., Withers, M. R., Siangla, J., McKinney, D., Onyango, M., Cummings, J. F., Milman, J., Tucker, K., Soisson, L. et al.** (2007). Phase 1 randomized double-blind safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* malaria merozoite surface protein FMP1 vaccine, adjuvanted with AS02A, in adults in western Kenya. *Vaccine* **25**, 176-184.
- Stowers, A. und Carter, R.** (2001). Current developments in malaria transmission-blocking vaccines. *Expert Opin Biol Ther* **1**, 619-628.
- Talman, A. M., Domarle, O., McKenzie, F. E., Ariey, F. und Robert, V.** (2004). Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* **3**, 24.
- Taylor-Robinson, A. W.** (2000). Vaccination against malaria: targets, strategies and potentiation of immunity to blood stage parasites. *Front Biosci* **5**, E16-29.
- Templeton, T. J., Fujioka, H., Aikawa, M., Parker, K. C. und Kaslow, D. C.** (1997). *Plasmodium falciparum* Pfs40, renamed Pf39, is localized to an intracellular membrane-bound compartment and is not sexual stage-specific. *Mol Biochem Parasitol* **90**, 359-365.
- Templeton, T. J., Keister, D. B., Muratova, O., Procter, J. L. und Kaslow, D. C.** (1998). Adherence of erythrocytes during exflagellation of *Plasmodium falciparum* microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycoporphins. *J Exp Med* **187**, 1599-1609.
- Templeton, T. J., Kaslow, D. C. und Fidock, D. A.** (2000). Developmental arrest of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* within the mosquito midgut via CTRP gene disruption. *Mol Microbiol* **36**, 1-9.
- Templeton, T. J., Iyer, L. M., Anantharaman, V., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Subramanian, G. M., Hoffman, S. L., Abrahamsen, M. S. und Aravind, L.** (2004). Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. *Genome Res* **14**, 1686-1695.
- Tewari, R., Dorin, D., Moon, R., Doerig, C. und Billker, O.** (2005). An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol* **58**, 1253-1263.
- Tomas, A. M., Margos, G., Dimopoulos, G., van Lin, L. H., de Koning-Ward, T. F., Sinha, R., Lupetti, P., Beetsma, A. L., Rodriguez, M. C., Karras, M. et al.** (2001). P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J* **20**, 3975-3983.
- Torres, J. A., Rodriguez, M. H., Rodriguez, M. C. und de la Cruz Hernandez-Hernandez, F.** (2005). *Plasmodium berghei*: effect of protease inhibitors during gametogenesis and early zygote development. *Exp Parasitol* **111**, 255-259.
- Trager, W. und Jensen, J. B.** (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673-675.

- Trager, W. und Gill, G. S.** (1992). Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Protozool* **39**, 429-432.
- Trager, W., Gill, G. S., Lawrence, C. und Nagel, R. L.** (1999). *Plasmodium falciparum*: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. *Exp Parasitol* **91**, 115-118.
- Trexler, M., Banyai, L. und Patthy, L.** (2000). The LCCL module. *Eur J Biochem* **267**, 5751-5757.
- Trottein, F., Triglia, T. und Cowman, A. F.** (1995). Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Mol Biochem Parasitol* **74**, 129-141.
- Trueman, H. E., Raine, J. D., Florens, L., Dessens, J. T., Mendoza, J., Johnson, J., Waller, C. C., Delrieu, I., Holders, A. A., Langhorne, J. et al.** (2004). Functional characterization of an LCCL-lectin domain containing protein family in *Plasmodium berghei*. *J Parasitol* **90**, 1062-1071.
- Tsai, Y. L., Hayward, R. E., Langer, R. C., Fidock, D. A. und Vinetz, J. M.** (2001). Disruption of *Plasmodium falciparum* chitinase markedly impairs parasite invasion of mosquito midgut. *Infect Immun* **69**, 4048-4054.
- Vaidya, A. B., Morrissey, J., Plowe, C. V., Kaslow, D. C. und Wellems, T. E.** (1993). Unidirectional dominance of cytoplasmic inheritance in two genetic crosses of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* **13**, 7349-7357.
- van Dijk, M. R., Janse, C. J., Thompson, J., Waters, A. P., Braks, J. A., Dodemont, H. J., Stunnenberg, H. G., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W. und Eling, W.** (2001). A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell* **104**, 153-164.
- van Schaijk, B. C., van Dijk, M. R., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G. J., van Dooren, M. W., Eksi, S., Roeffen, W. F., Janse, C. J., Waters, A. P. und Sauerwein, R. W.** (2006). Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45, is a female specific surface protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **149**, 216-222.
- Vermeulen, A. N., Ponnudurai, T., Beckers, P. J., Verhave, J. P., Smits, M. A. und Meuwissen, J. H.** (1985). Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med* **162**, 1460-1476.
- Vermeulen, A. N., van Deursen, J., Brakenhoff, R. H., Lensen, T. H., Ponnudurai, T. und Meuwissen, J. H.** (1986). Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. *Mol Biochem Parasitol* **20**, 155-163.
- Wagner, C., Scholz, S. M., Abreu, A., Frank, R., Templeton, T. J. und Pradel, G.** (2006). Molecular interactions between PfCCp multidomain adhesion proteins during gametogenesis in *Plasmodium falciparum*. In: *Proceedings of the ICOPA XI Meeting*, Medimond, S. 631-635.
- Whitney, G. S., Starling, G. C., Bowen, M. A., Modrell, B., Siadak, A. W. und Aruffo, A.** (1995). The membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site. *J Biol Chem* **270**, 18187-18190.

- Wiesner, J. und Jomaa, H.** (2007). Isoprenoid biosynthesis of the apicoplast as drug target. *Curr Drug Targets* **8**, 3-13.
- Williams, J. L.** (1999). Stimulation of *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis by conditioned medium from parasite cultures. *Am J Trop Med Hyg* **60**, 7-13.
- Williamson, K. C.** (2003). Pfs230: from malaria transmission-blocking vaccine candidate toward function. *Parasite Immunol* **25**, 351-359.
- Williamson, K. C., Criscio, M. D. und Kaslow, D. C.** (1993). Cloning and expression of the gene for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen, Pfs230. *Mol Biochem Parasitol* **58**, 355-358.
- Williamson, K. C., Keister, D. B., Muratova, O. und Kaslow, D. C.** (1995). Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes. *Mol Biochem Parasitol* **75**, 33-42.
- Williamson, K. C., Fujioka, H., Aikawa, M. und Kaslow, D. C.** (1996). Stage-specific processing of Pfs230, a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. *Mol Biochem Parasitol* **78**, 161-169.
- Withers, M. R., McKinney, D., Ogutu, B. R., Waitumbi, J. N., Milman, J. B., Apollo, O. J., Allen, O. G., Tucker, K., Soisson, L. A., Diggs, C. et al.** (2006). Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clin Trials* **1**, e32.
- Wu, Y., Kirkman, L. A. und Wellems, T. E.** (1996). Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1130-1134.
- Wu, Y., Przysiecki, C., Flanagan, E., Bello-Irizarry, S. N., Ionescu, R., Muratova, O., Dobrescu, G., Lambert, L., Keister, D., Rippeon, Y. et al.** (2006). Sustained high-titer antibody responses induced by conjugating a malarial vaccine candidate to outer-membrane protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18243-18248.
- Yu, Q., Reichert, M., Brousseau, T., Cleuter, Y., Burny, A. und Kettmann, R.** (1990). Sequence of bovine CD5. *Nucleic Acids Res* **18**, 5296.
- Yuda, M., Sakaida, H. und Chinzei, Y.** (1999). Targeted disruption of the *plasmodium berghei* CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *J Exp Med* **190**, 1711-1716.
- Yuda, M., Yano, K., Tsuboi, T., Torii, M. und Chinzei, Y.** (2001). von Willebrand Factor A domain-related protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout *Plasmodium* parasites. *Mol Biochem Parasitol* **116**, 65-72.
- Zimmerman, P. A., Mehlotra, R. K., Kasehagen, L. J. und Kazura, J. W.** (2004). Why do we need to know more about mixed *Plasmodium* species infections in humans? *Trends Parasitol* **20**, 440-447.

Zou, L., Miles, A. P., Wang, J. und Stowers, A. W. (2003). Expression of malaria transmission-blocking vaccine antigen Pfs25 in *Pichia pastoris* for use in human clinical trials. *Vaccine* **21**, 1650-1657.

Internetseiten

http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Malaria_distribution-%28de%29.png

www.bio-rad.com

www.cdc.gov/malaria/disease.htm

www.emdbiosciences.com

www.fermentas.de

www.ge.com

www.gpk.de/downloadp/STIKO_2007_Bulletin35_070831_Influenza_assozierte_Mortalitaet_in_Deutschland.pdf

www.invitrogen.com

www.stratagene.com

www.who.int

Abkürzungen und Einheiten

A _x	Absorption bei einer Wellenlänge von x Nanometern
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
AMA	<i>apical membrane antigen</i>
Anth	<i>anthrax protective antigen</i>
ApicA	Apikomplexa-spezifisch
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bd.	Band
bp	Basenpaare
BRK	Bayerisches Rotes Kreuz
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIG	Digoxygenin
Disc	Discoidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDAC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtBr	Ethidiumbromid

evtl.	eventuell
F	Farad, Einheit der elektrischen Kapazität
FN2	Fibronectin-Typ2
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GA	Glutaraldehyd
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
IB	<i>Inclusion Bodies</i>
IFA	Immunfluoreszenzstudien
inkl.	inklusive
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thigalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCCL	<i>Limulus Coagulation Factor C</i>
Lev	Levanase
LH	Lipoxygenase-homolog
LSA	Leberstadienantigen
μ	mikro
m	milli bzw. Meter
mm	Millimeter
M	molar
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Min.	Minuten
MSP	<i>merozoite surface protein</i>
n	nano
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NEC	Neurexin-Kollagen

NGS	Neutrales Ziegenserum
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	pico
P	Poster
<i>P</i>	<i>Plasmodium</i>
p. a.	<i>pro analysi</i> , Reinheitsgrad
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PFA	Paraformaldehyd
psi	<i>pounds per square inch</i> , Druckeinheit
pt	Peptid
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
RESA	<i>ring infected erythrocyte surface antigen</i>
Ric	Ricin
RNA	Ribonukleinsäure
rp	rekombinantes Protein
RPMI-Medium	Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
S.	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SR	<i>scavenger receptor</i>
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBSM	Milchpulver in TBS
TBV	Transmissionsblockierende Vakzine
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRAP	<i>thrombospondin related adhesion protein</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
V	Volt bzw. Vortrag
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
WMC	Weill Medical College
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1. Weltweite Malariarisikogebiete.

¹ Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Malaria_distribution_%28de%29.png

Abb. 1.2. Dreidimensionale Organisation von *P. falciparum*-Stadien.

² Quelle: Bannister *et al.*, 2000, verändert

Abb. 1.3. Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*.

³ Quelle: Griffith *et al.*, 2007, verändert

Abb. 1.4. Die fünf Reifestadien von Gametozyten.

⁴ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 1.5. Ultrastruktur eines *P. falciparum*-Gametozyten.

⁵ Quelle: G. Pradel, verändert

Abb. 1.6. Exflagellationszentrum bei 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop.

⁶ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 1.7. Übersicht der Morphologie der vier verschiedenen humanpathogenen Plasmodienarten.

⁷ Quelle: www.documentation.ledamed.org/IMG/html/doc-10811.html, verändert

Abb. 1.8. Übersicht der Vakzinstrategien in der Malariaforschung.

⁸ Quelle: Richie und Saul, 2002

Abb. 1.9. Aufbau der PfCCp-Multiadhäsionsdomänenproteine.

⁹ Quelle: G. Pradel

Abb. 1.10. Expression von PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3.

¹⁰ Quelle: Scholz *et al.*, in Druck

Abb. 1.11. Freisetzung und Matrixbildung am Beispiel von PfCCp1 während der Gametenbildung.

¹¹ Quelle: Pradel *et al.*, 2004

Abb. 1.12. Ko-Lokalisationsstudien von PfCCp-Proteinen.

¹² Quelle: Pradel *et al.*, 2006

Abb. 2.1. pSUMO/pSMT3- Expressionsvektor mit multipler Klonierungsstelle.

¹³ Quelle: www.emdbiosciences.com, verändert

Abb. 2.2. pGex-4T-1 Expressionsvektor mit multipler Klonierungsstelle.

¹⁴ Quelle: www.ge.com

Abb. 2.3. Vektor pBluescript als Basis des KO- Vektors pDT-Tg23.

¹⁵ Quelle: www.stratagene.com

Abb. 2.4. DNA-Molekulargewichtsstandards von MBI/Fermentas.

¹⁶ Quelle: www.fermentas.de

Abb. 2.5. Proteingrößenstandards.

¹⁷ Quelle: www.fermentas.de; www.invitrogen.com

Abb. 2.6. Membranfütterung von *Anopheles stephensi*.

¹⁸ Quelle: T. J. Templeton

Abb. 2.7. Nomenklatur der Körperabschnitte von *Anopheles*.

¹⁹ Quelle: www.vectorbase.org, verändert

Abb. 2.8. *Anopheles*-Präparate.

²⁰ Quelle: T. J. Templeton und www.cdc.gov

Abb. 2.9. Blutausstrich.

²¹ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 2.10. Schema eines Accudenz™-Gradienten.

²² Quelle: S. M. Scholz

Abb. 2.11. Schema des *PfCCp4*-Genlokus vor und nach Genausschaltung - Übersicht 1.

²³ Quelle: Scholz *et al.*, in Druck, verändert

Abb. 2.12. Reaktionsschema einer indirekten Immunfluoreszenz.

²⁴ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 2.13. Schema des Präparatzuschnitts nach Eponeinbettung.

²⁵ Quelle: EM-Praktikumsanleitung von Prof. Dr. Krohne

Abb. 2.14. Relative Position und Größe der amplifizierten *PfCCp4*-Genabschnitte.

²⁶ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 2.15. Schema des *PfCCp4*-Genlokus vor und nach Genausschaltung - Übersicht 2.

²⁷ Quelle: Scholz *et al.*, in Druck, verändert

Abb. 2.16. Schema eines Southern-Blot-Aufbaus.

²⁸ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 2.17. Komponenten der Mini-Protean-3-Apparatur von Bio-Rad.

²⁹ Quelle: www.bio-rad.com

Abb. 2.18. Aufbau eines Western Blots.

³⁰ Quelle: www.bio-rad.com, verändert

Abb. 2.19. Schemadarstellung einer Affinitätschromatographie nach dem Köder-Beute-Prinzip.

³¹ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 2.20. Prinzip der Ko-Immünpräzipitation am Beispiel von *PfCCp4*.

³² Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.1. Relative Position der rekombinanten *PfCCp4*-Proteine.

³³ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.2. Expressionskontrolle von *PfCCp4rp1*.

³⁴ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.3. Expressionskontrolle von *PfCCp4rp2*.

³⁵ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.4. Expressionskontrolle der Konstrukte *PfCCp4rp3-pGex*, *PfCCp4rp4-pGex* und *PfCCp4rp5-pGex*.

³⁶ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.5. Proteinausbeute nach *Inclusion-Body*-Aufreinigung der rekombinanten *PfCCp4*-Proteine.

³⁷ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.6. Proteinausbeute der Fusionspeptide nach *Inclusion-Body*-Aufreinigung.

³⁸ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.7. Western-Blot-Analysen polyklonaler Mausseren an ihren rekombinanten Proteinen.

³⁹ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.8. Sexualstadienspezifische Transkriptexpression von *PfCCp4*.

⁴⁰ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.9. Western-Blot-Analysen der produzierten *PfCCp4*-Antiseren an Parasitenlysat.

⁴¹ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.10. Detaillierte Expressionsanalyse von *PfCCp4* auf Proteinebene.

⁴² Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.11. *PfCCp4*-Expression in jungen Gametozyten.

⁴³ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.12. *PfCCp4*-Expression in asexuellen Parasitenstadien.

⁴⁴ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.13. Geschlechtsspezifische Expression von *PfCCp4* in Gameten.

⁴⁵ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.14. *PfCCp4*-Expression in Makro- und Mikrogametozyten.

⁴⁶ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.15. Wiederaufnahme der *PfCCp4*-Expression während der Ookinetenreifung.

⁴⁷ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.16. *Pfs25*-Expression in Gametozyten.

⁴⁸ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.17. Expression von *PfCCp4* innerhalb der parasitophoren Vakuole.

⁴⁹ Quelle: Scholz *et al.*, in Druck

Abb. 3.18. Ultrastrukturelle Lokalisation von *PfCCp4* in reifen Gametozyten.

⁵⁰ Quelle: G. Pradel, S. M. Scholz

Abb. 3.19. Diagnostische PCR an gDNA von WT-Parasiten und den fünf *PfCCp4*-KO-Klonen.

⁵¹ Quelle: Scholz *et al.*, in Druck

Abb. 3.20. Southern-Blot-Analyse.

⁵² Quelle: Scholz *et al.*, in Druck

Abb. 3.21. *PfCCp4*-Transkriptexpression in *PfCCp4*-KO-Parasiten.

⁵³ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.22. Unterdrückung der *PfCCp4*-Expression in *PfCCp4*-KO-Parasiten

⁵⁴ Quelle: S. M. Scholz und Scholz *et al.*, in Druck

Abb. 3.23. Western-Blot-Analysen zur ko-abhängigen *PfCCp*-Expression.

⁵⁵ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.24. *PfCCp4*-unabhängige Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*.

⁵⁶ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.25. Unveränderte *PfCCp4*-Expression in *PfCCp1*-, *PfCCp2*- sowie *PfCCp3*-KO-Klonen.

⁵⁷ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.26. Ko-Lokalisation von *PfCCp4* und *Pfs230*.

⁵⁸ Quelle: Scholz *et al.*, in Druck

Abb. 3.27. *Pfs230*-Expression in *PfCCp4*-KO-Parasiten.

⁵⁹ Quelle: Scholz *et al.*, in Druck

Abb. 3.28. Übersicht rekombinanter *PfCCp*-Proteine.

⁶⁰ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.29. Ko-Immunpräzipitationsstudien innerhalb der *PfCCp*-Familie mit *PfCCp4* als Köder.

⁶¹ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.30. Ko-Immunpräzipitationsstudien von *PfCCp4*, *Pfs230* und *Pfs48/45*.

⁶² Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.31. Ko-Immunpräzipitationsstudien von *PfCCp4* und weiteren sexualstadienspezifischen Proteinen.

⁶³ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.32. Aufreinigung rekombinanter *PfCCp*-Proteine für Zelladhäsionsstudien.

⁶⁴ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.33. Zelladhäsion *PfCCp*-beschichteter, fluoreszierender Latex-*beads*.

⁶⁵ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 3.34. Zelladhäsionsstudien rekombinanter *PfCCp*-Proteine.

⁶⁶ Quelle: S. M. Scholz

Abb. 4.1. Hypothese der Proteinkomplexbildung während der Sexualphase von *P. falciparum*.

⁶⁷ Quelle: S. M. Scholz nach G. Pradel

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.1. Morphologische Unterschiede während der Gametozytogenese von *P. falciparum*
- Tab. 2.1. Verwendete Geräte und Hersteller
- Tab. 2.2. Puffer und Lösungen
- Tab. 2.3. Medien und Agarplatten
- Tab. 2.4. Oligonukleotide
- Tab. 2.5. Antikörper
- Tab. 2.6. Proteine und zugehörige PlasmoDB-Identifizierungsnummern
- Tab. 2.7. Auflistung der in Ko-Immunitationsstudien eingesetzten Antikörpervolumina
- Tab. 3.1. Größe der rekombinanten PfCCp4-Fragmente
- Tab. 3.2. Membranfütterungen von *Anopheles stephensi* an WT- und PfCCp4-KO-Gametozyten
- Tab. 3.3. Interaktionsstudien rekombinanter PfCCp-Proteine
- Tab. 3.4. Übersicht identifizierter Interaktionen zwischen rekombinanten PfCCp-Domänen
- Tab. 4.1. Ko-abhängiges Expressionsprofil von Adhäsionsproteinen während der Befruchtungsvorgänge in *P. falciparum*

Curriculum Vitae



Sabrina M. Scholz
Neydeckgasse 5
97082 Würzburg

sabrina-maria.scholz@web.de

Persönliche Angaben

Geboren am 11. Januar 1980, in Erlenbach am Main

Familienstand: ledig

Religion: römisch-katholisch

Ausbildung

06/1999 Abitur

Gymnasium der Englischen Fräulein Aschaffenburg

Hauptfächer: Biologie, Latein, Mathematik, Erdkunde

Note: 1,7

10/1999 - 06/2004 Diplom in Biologie

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Zell- und Entwicklungsbiologie

Note: sehr gut (1,0)

➤ Diplomarbeit (Labor Prof. Dr. Petra Knaus, Physiologische Chemie):

Charakterisierung von BMP-Typ-II-Rezeptor-assoziierten Proteinen mittels si-RNA-Technologie.

Seit 01/2005 Doktorandin

Zentrum für Infektionsforschung, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

➤ Doktorarbeit (Labor Dr. Gabriele Pradel):

Analyse von zellulären und molekularen Wechselwirkungen der PfCCp-Multiadhäsionsdomänenproteine und funktionale Charakterisierung von PfCCp4 in den Sexualstadien des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*.

Auszeichnungen

06/2004 **Diplom mit Auszeichnung**

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

12/2005 **Reisekostenzuschuss**

zur 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Wien, Österreich

06/2006 – 10/2006 **Kurzstipendium für Doktoranden**

Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), Bonn

10/2006 **Outstanding Talk**

XVII Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA

03/2007 **Ausgezeichnetes Poster**

Young Investigator Meeting, Würzburg

Auslandserfahrung

07/1999 – 09/1999 **Untrained Teacher**

Diözese Mbala-Mpika, Zambia

Primary School Kopa, Klasse 9

➤ Fächer: Mathematik, Englisch

06/2006 – 10/2006 **Visiting Graduate Assistant**

Weill Medical Center of Cornell University, New York, USA

Labor Prof. Dr. Thomas J. Templeton

➤ Forschung: Characterization of novel candidates for transmission blocking vaccines in *Plasmodium falciparum*.

Lehrtätigkeiten

Studentische Hilfskraft

07/2002 Lehrstuhl für Mikrobiologie und Genetik, Universität
Würzburg

03/2003 Lehrstuhl für Zoologie, Universität Würzburg

09/2003 - 05/2004 Lehrstuhl für Physiologische Chemie, Universität Würzburg

Mentor für Studierende

Seit 04/2005

Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg

Sonstige Praktika und Berufserfahrung

07/2004 – 09/2004 Trainee

Procter & Gamble, Abteilung für Research & Development
European Technical Center Schwalbach/Ts., Deutschland

11/2004 – 12/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Labor Prof. Dr. Thomas Roitsch

➤ Forschung: Der Einfluss von Zuckern und deren Konzentration auf das Wurzelwachstum in *Arabidopsis spec.*

Sprachen

Deutsch: Muttersprache, exzellent in Wort und Schrift

Englisch: hervorragend in Wort und Schrift

Spanisch: rudimentär

Computerfertigkeiten

Microsoft Office: Power Point, Word, Excel

Adobe® Anwendungsprogramme: Acrobat Reader, Acrobat Distiller, Adobe Photoshop und andere Bildbearbeitungsprogramme (Corel Draw)

Internetrecherchen

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Scholz, S. M., Dude, M.-A. und Pradel, G. (2005). Malaria – vom Genom zum Impfstoff. *Bioforum*, 28 (10):71-73.

Wagner, C., **Scholz, S. M.**, Abreu, A., Frank, R., Templeton, T. J. und Pradel, G. (2006). Molecular interactions between *PfCCp* multidomain adhesion proteins during gametogenesis in *Plasmodium falciparum*. Proceedings of the ICOPA XI meeting, Medimond, 631-635.

Scholz, S. M., Simon, N., Lavazec, C., Dude, M.-A., Templeton, T. J. und Pradel, G. (2007). *PfCCp* proteins of *Plasmodium falciparum*: gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *Int J Parasitol*, in Druck.

Simon, N., **Scholz, S. M.**, Frank, R., Dude, M.-A., Moreira, C., Templeton, T. J. und Pradel, G. (2008). *PfCCp* proteins form adhesive complexes during the sexual phase of *Plasmodium falciparum*. *EMBO J*, in Bearbeitung.

Konferenzbeiträge

Scholz, S. M., Lavazec, C., Templeton, T. J. und Pradel, G. (2006). LCCL Multi-domain adhesion protein family member *PfCCp4* is involved in malaria transmission to the mosquito. 22. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Wien, S. 103. (V)

Scholz, S. M., Wagner, C., Dude, M.-A., Abreu, A., Frank, R., Templeton T. J. und Pradel, G. (2006). The *PfCCp* multi-domain adhesion proteins form a complex during gametogenesis of *Plasmodium falciparum*. Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, Massachusetts, Zusammenfassung 5B. (V)

Scholz, S. M., Dude, M.-A., Wagner, C., Templeton T. J. und Pradel, G. (2006). *PfCCp* multi-adhesion domain proteins are essential for malaria transmission to the mosquito. 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., Würzburg, *Int J Med Microbiol* 296 (Sppl. 3), Zusammenfassung EKV01. (P)

Scholz, S. M., Dude, M.-A., Lavazec, C., Simon, N., Templeton T. J. und Pradel, G. (2007). Evaluation of the *PfCCp* multi-domain adhesion proteins as candidates for transmission blocking vaccines. Young Investigator Meeting, Würzburg. (P)

Scholz, S. M., Simon, N., Frank, R., Dude, M.-A., Abreu, A., Templeton T. J. und Pradel, G. (2007). Molecular interactions of *PfCCp* multidomain adhesion proteins during gametogenesis in *Plasmodium falciparum*. 5. Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Malaria der Paul-Ehrlich-Gesellschaft, Würzburg. (V)

Scholz, S. M., Simon, N., Dude, M.-A., Frank, R., Kühn, A., Moreira, C., Abreu, A., Templeton T. J. und Pradel, G. (2008). Molecular interactions of sexual stage adhesion proteins during gametogenesis of *Plasmodium falciparum*. 23. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg. (V)