

Aus dem Institut für Bioinformatik
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Thomas Dandekar

**Untersuchung von gene-drive-Strategien als neue Interventionsstrategien
zur Eindämmung der Malaria**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tobias Löwe
aus Würzburg

Würzburg, April 2008

Referent: Prof. Dr. T. Dandekar

Koreferent: Prof. Dr. U. Walter

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

05. August 2008

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I. 1 Die globale Bürde der Malaria	1
I. 2 Der Kampf gegen die Malaria	4
I. 3 Aktuelle Probleme der Malariabekämpfung	6
I. 4 Genetische Manipulationsstrategien zur Eindämmung der Malaria	9
II. Material und Methoden	11
II. 1 Bioinformatische Analysen	11
- Primäre Datenbanken	
- Domänen- und Motiv-Datenbanken	
- Strukturdatenbanken	
- Datenbank-Suchalgorithmen	
- Strukturvorhersageprogramme	
- Pathway-Datenbanken und Pathway-Rekonstruktion	
II. 2 Mathematische Modellierung	16
II. 3 Molekularbiologische Techniken	17
III. Resultate	17
III. 1 Analyse und Erarbeitung der Grundlagen für die Implementierung der neuen Strategien	17
III. 1. 1 Resistenz-Kalkulationen	17
III. 1. 2 Homing-Endonuclease-Gene	21
III. 2 Ein neues Gen-Konversionskonstrukt und Verfahren zur Vererbung von Genmobilität	27
III. 3 Alternatives und effizienteres Gen-Konversionskonstrukt und Verfahren zur Vererbung von Genmobilität sowie Verwendung des Konstruktes	30
III. 4 Nutzung der vorgestellten Konstrukte zur Bekämpfung der Malaria	43
III. 4. 1 Anopheles-targets	44
III. 4. 2 Alternativansatz für die Fixierung natürlicher Resistenzgene	48
III. 4. 3 Plasmodien-targets	50

III. 4. 3. 1 Eradikation der Plasmodien	50
III. 4. 3. 2 Einführung einer mildereren Plasmodien-Art	51
IV. Diskussion	60
IV. 1 Alternative Ansätze: Pharmaka, Insektizide, Vakzinen	61
IV. 2 Alternative gene-drive-Systeme	65
IV. 3 Wesentliche Neuerungen der vorliegenden Arbeit	69
V. Zusammenfassung	72
VI. Literatur	74

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACT: artemisinin-combination therapy
AGPAT: 1-Acylglycerol-3-phosphat-O-acyltransferase
AGPS: Alkylglyceron-phosphat-synthase
AS: Aminosäure
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
DAG: Diacylglycerol
E.C.: Enzyme Commission
GAP: genetically attenuated parasite
GI: GeneBank gene identifier
GPI: Glycosyl-phosphatidylinositol
IEP: intron encoded protein
IPT: Intermittent Preventive Treatment
IRS: Indoor Residual Spraying
ITN: insecticide-treated bed nets
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
OMIM: online Mendelian Inheritance in Man
ORF: open reading frame
PDB: Protein Data Bank
Pfam: Protein Families Database of Alignments and HMMs
PRBC: parasite-infected red blood cells
SM1: salivary gland and midgut binding peptide 1
SMART: Simple Modular Architecture Research Tool
TDR: transmission distortion ratio

I. Einleitung

I.1 Die globale Bürde der Malaria

Weltweit sind 3,2 Milliarden Menschen (107 Länder) von einer Infektion durch Malaria bedroht (Abb. 1).

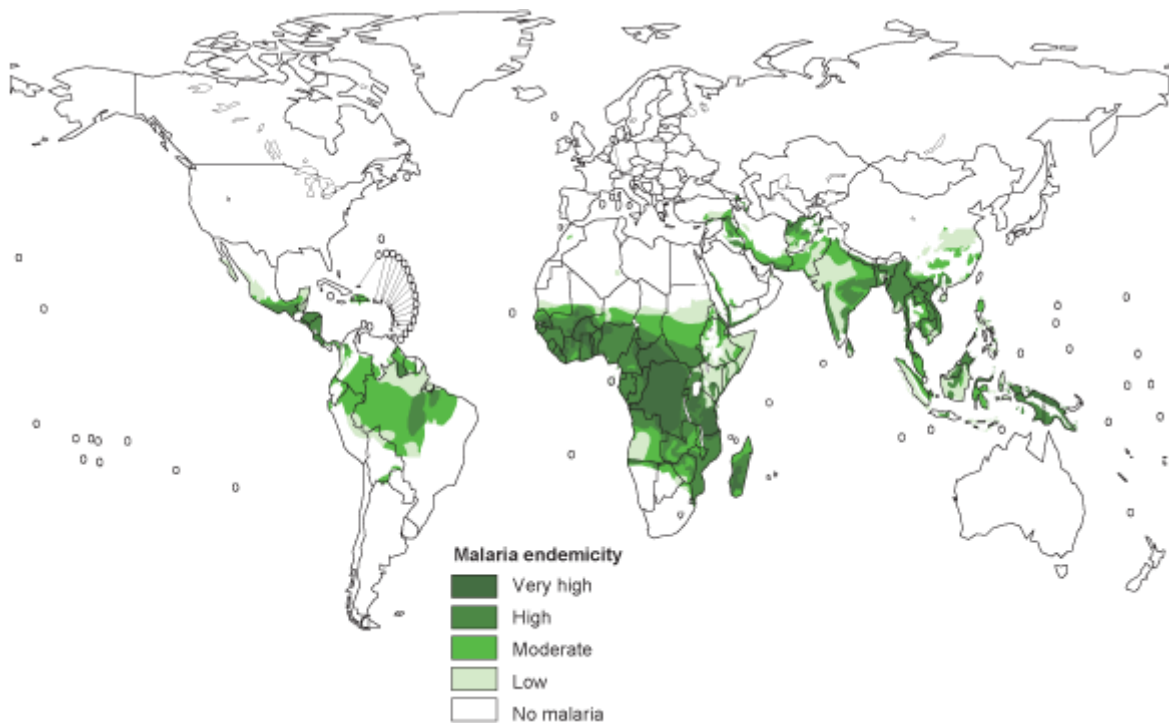


Abb. 1: Globale Verteilung der Malaria-Endemiegebiete

Dargestellt ist das globale Verteilungsmuster der Malaria, gestaffelt nach der Infektionshäufigkeit.

Aus: The World Malaria Report 2005, World Health Organisation / UNICEF

Pro Jahr werden 350 bis 500 Millionen klinische Fälle registriert. Infektionen durch *P. falciparum* führen jährlich zu mehr als einer Million Todesfälle und machen die Malaria neben AIDS und Tuberkulose zu einer der drei häufigsten infektiösen Todesursachen. Hinzu kommen epidemiologisch schwer zu beziffernde indirekte Todesfälle, welche sich durch negative Synergismen mit häufig beobachteten Komorbiditäten ergeben. Aufgrund einer noch nicht ausgebildeten Immunität sind von einem tödlichen Verlauf vor allem Kinder unter 5 Jahren bedroht (The World Malaria Report 2005).

Der südlich der Sahara befindliche Teil Afrikas ist mit Abstand das Gebiet der Erde, welches am meisten unter der Seuche zu leiden hat. 89% der Malaria-assoziierten Todesfälle betreffen diese Region. Ein Fünftel der Kindersterblichkeit ist dort auf Malaria tropica zurückzuführen. Die hohe Sterblichkeit in Afrika erklärt sich vor allem durch den hohen Anteil der Infektionen mit *P. falciparum* (93%) an allen klinischen Fällen. Die konstant hohen Infektionsraten wiederum sind in der Präsenz des effizientesten und am schwierigsten zu kontrollierenden Vektors, *A. gambiae*, auf diesem Kontinent begründet (Greenwood und Mutabingwa, 2002). [Die Blutmahlzeit dient den Moskitos vor allem als Eiweißquelle für die Reifung der Eier, weshalb auch nur weibliche Moskitos stechen.] Bemerkenswert ist hierbei die ausgesprochene Anthropophilie dieser Spezies (Coluzzi, 1999; Sachs und Malaney, 2002). Die Armut der betroffenen Bevölkerung steigert natürlich ihre Anfälligkeit für die Erkrankung. In diesem Kontext sind besonders folgende kausale Faktoren relevant: Bevölkerungsbewegungen, Mangelernährung, Komorbiditäten, mangelnder Schutz der Behausungen vor Moskitos und fehlender Zugang zu medizinischer Versorgung. Die durch Malaria verursachte Morbidität ist ebenfalls beträchtlich. Bedeutsam sind besonders die Anämie bei Kindern und Schwangeren, ein oft vermindertes Geburtsgewicht der betroffenen Kinder, eine vermehrte Frühgeburtslichkeit und eine erhöhte Abortneigung. Außerdem können sowohl eine Infektion der Mutter während der Schwangerschaft als auch eine Infektion des Kindes (betrifft nicht nur die cerebrale Malaria) die kognitive Entwicklung des Kindes beeinträchtigen. Dieser Umstand hat wiederum negative Auswirkungen auf die wirtschaftliche Entwicklung der Region (Sachs und Malaney, 2002; s. u.). Des Weiteren führt die Malaria u. a. zu hyperreaktiver Splenomegalie, chronischer Nierenschädigung und nephrotischem Syndrom. Das endemische Burkitt-Lymphom (häufigster maligner Tumor bei Kindern in Afrika) tritt nur in Regionen mit hoher Übertragungsrate von *P. falciparum* auf (Warrell und Gilles, 2002).

Die Malaria belastet wie kaum eine andere Krankheit das Gesundheitssystem der betroffenen – meist unterentwickelten – Länder. Sie ist in Afrika für 25 – 35% aller Hausbesuche und 20 – 40% der Krankenhauseinweisungen verantwortlich. Besondere Risikogruppen stellen außer Kleinkindern Schwangere - vor allem Erstgebärende (Matuschewski, 2006) - und HIV-Infizierte dar. Malaria und HIV verschlimmern ihre Symptome gegenseitig. Sie erhöhen synergistisch die Mortalität und Morbidität sowie die Belastung der Gesundheitssysteme. Eine Malariainfektion

beschleunigt die virale Replikationsrate und trägt somit zu einem Progress und einer erhöhten Übertragungsrate der Krankheit bei. Letztere wird auch durch den gesteigerten Bedarf an Bluttransfusionen durch die malariaassoziierte Anämie begründet.

Möglicherweise sind die tatsächliche Mortalität und Morbidität noch weitaus dramatischer, da die Gebiete mit den höchsten Übertragungsraten (tropisches Afrika) kaum epidemiologisch verwertbare Daten an die WHO übermitteln. Deshalb ist die wirkliche Gesundheitsbelastung durch Malaria auch nur sehr schwer abzuschätzen.

Die oben dargestellte Kausalität zwischen Armut und Malaria ist nicht einseitig, vielmehr bedingen sich beide gegenseitig. Die Zusammenschau der globalen epidemiologischen Daten zur Malaria (Abb. 1) und der Verteilung des Pro-Kopf-Bruttoinlandsprodukts (Abb. 2) zeigt eine eindeutige Korrelation zwischen Armut und Malaria.

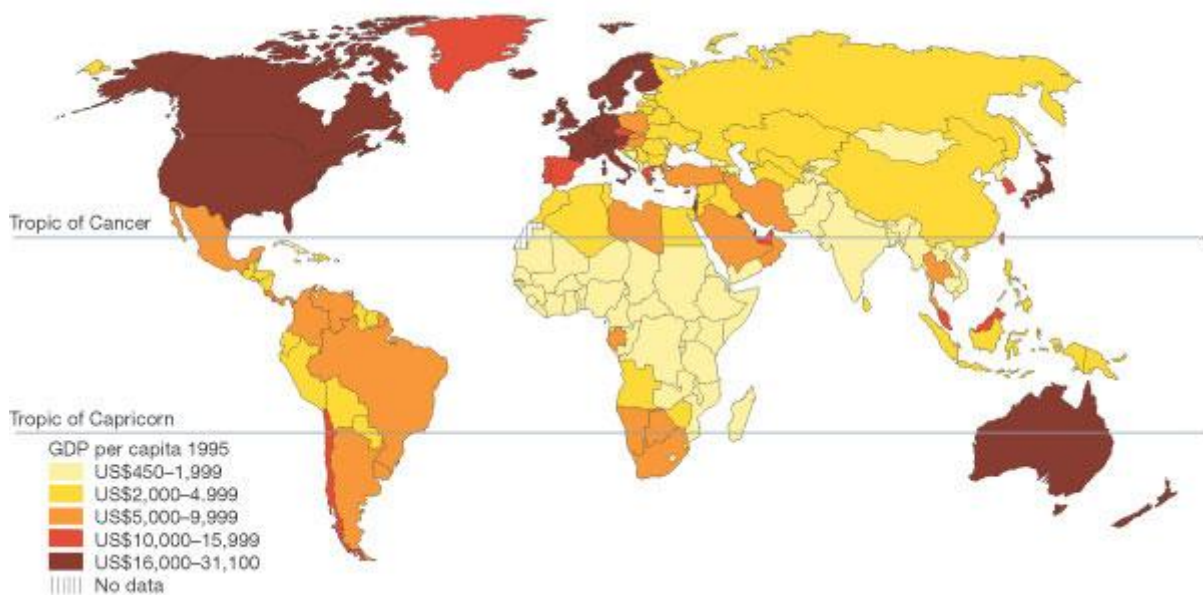


Abb 2: Globale Wohlstandsverteilung

Abgebildet ist die Zuordnung des Pro-Kopf-Bruttoinlandsprodukts (GDP per capita) zu den einzelnen Staaten der Welt.

Aus : Sachs und Malaney, 2002

Die Krankheit hat katastrophale Auswirkungen auf die sozialen und ökonomischen Entwicklungsmöglichkeiten der betroffenen Regionen (Sachs und Malaney, 2002). Eine verminderte Produktivität bedingt in Ländern mit hoher Übertragungsrate eine

Reduktion des Wirtschaftswachstums um 1,3 Prozentpunkte. Diese Beeinträchtigung des jährlichen Wirtschaftswachstums kann das Bruttosozialprodukt eines Malariagebietes, verglichen mit malariefreien Zonen, langfristig um mehr als die Hälfte reduzieren. Sachs und Malaney (2002) zeigen, dass sich die entstehenden Kosten bei weitem nicht allein auf direkte Aufwendungen für Prävention und Therapie beschränken. Die Malaria beeinflusst sowohl den Einzelhaushalt (Schulbesuch, Spar- und Migrationsverhalten etc.) als auch die gesamtwirtschaftliche Situation eines Landes (Tourismus, Handel, Auslandsinvestitionen usw.) negativ und trägt so zu einer Stagnation der wirtschaftlichen Misere und Armut in Entwicklungsländern bei. Auf der anderen Seite kann aus den geschilderten Zusammenhängen positiv gefolgert werden, dass eine Reduktion der Malariaübertragung in Dritte-Welt-Ländern einen deutlichen Impuls für die wirtschaftlichen Entwicklungsmöglichkeiten der Staaten darstellen würde.

Die Hauptursache für den in den letzten Jahrzehnten beobachteten Anstieg der weltweit registrierten Fälle und der damit zusammenhängenden Mortalität und Morbidität ist die Verbreitung von Resistenzen gegenüber billigen, ehemals effektiven Medikamenten sowie gegen Insektizide, welche für die Vektorkontrolle eingesetzt werden. Nachdem die Malaria in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts in Nordamerika und den größten Teilen Europas ausgerottet wurde, das weltweite Malaria-Eradikationsprogramm jedoch scheiterte, wurde sie von den Siebziger bis weit in die neunziger Jahre als globales Problem von internationalen Institutionen vernachlässigt. Außerdem führten regionale Faktoren wie Finanzkrisen, Bevölkerungsbewegungen und der Zusammenbruch von Gesundheitssystemen zu einem besorgniserregenden Vormarsch der Seuche. Gebiete, welche jahrelang als malariefrei galten, wurden wieder endemisch: u. a. Malaria tropica in Tadschikistan und Malaria durch *P. vivax* in Zentralasien und Transkaukasien.

I.2 Der Kampf gegen die Malaria

Seit dem Ende der neunziger Jahre werden wieder vermehrte Anstrengungen im Kampf gegen die Malaria betrieben. Die erste große Organisation, welche sich der Bekämpfung der Malaria verschrieb, war die 1997 gegründete Multilateral Initiative on Malaria (MIM). Die Roll-Back-Malaria-(RBM)-Initiative wurde 1998 von der WHO ins Leben gerufen. Sie soll die verschiedenen Gruppen, welche an der Eindämmung

der Malaria interessiert sind, vernetzen und hat sich das ehrgeizige Ziel gesetzt, die „Bürde der Malaria“ bis zum Jahr 2010 auf die Hälfte zu reduzieren. Bis 2015 soll dieses Ergebnis wiederholt werden. Die UN äußert sich in ihren Millennium Development Goals zurückhaltender: Bis 2015 werden die Verhinderung eines weiteren Anstiegs und ein beginnender Rückgang der Malariainzidenz angestrebt. Außerdem wurde ein nicht-profitorientiertes Pharmaunternehmen, die Medicines for Malaria Venture (MMV), mit dem Ziel gegründet, preiswerte und effiziente antiparasitäre Medikamente zu entwickeln.

Obgleich die verschiedenen Initiativen regional einige Erfolge verzeichnen können, ist es absehbar, dass die hochgesteckten Ziele von RBM nicht verwirklicht werden können. Es besteht weiterhin eine bedauerliche Diskrepanz zwischen den Bedürfnissen der meist armen Hochendemiegebiete und der Versorgung mit effektiven Kontrollstrategien (v. a. Kombinationsmedikamente, intermittierende präventive Behandlung [IPT] für schwangere Frauen und Kinder, insektizidbehandelte Moskitonetze [ITNs], Insektizideinsatz in Innenräumen [IRS], Vernichtung von Moskitolarven und Trockenlegung von Brutplätzen). Zwar nahmen viele afrikanische Länder seit 2000 die innovativen Prinzipien der Malariabekämpfung, welche durch die RBM-Partnerschaft empfohlen werden, in die Grundsätze ihrer Gesundheitspolitik formell auf. Dennoch werden diese Prinzipien in der Realität noch unzureichend umgesetzt. Obgleich 42 Länder die Behandlung mit ACTs formal übernommen haben, setzen nur neun Staaten diese auch wirklich um. So werden beispielsweise afrikanische Kinder meist (95%) noch mit Chloroquin behandelt, dessen Wirksamkeit aufgrund vorhandener Resistenzen als gering eingestuft werden muss. In Studien, welche von 1999 bis 2004 durchgeführt wurden, stellte sich außerdem heraus, dass nur 3% der Kinder unter fünf Jahren durch ITNs geschützt werden. Der Grund liegt vor allem in den finanziellen Aufwendungen, welche mit einer Implementierung der Vorgaben verbunden wären. Die geschätzten minimalen wirtschaftlichen Kosten für eine effiziente globale Malariabekämpfung belaufen sich auf 3,2 Milliarden US-\$ pro Jahr. Derzeit bestehen noch deutliche Probleme mit der Finanzierung dieses Betrages, besonders in Hochendemiegebieten. Diese Aussage erscheint besonders tragisch, wenn man die erwähnten Kosten beispielsweise mit dem geplanten Verteidigungsbudget der USA („war against terrorism“) für die nächsten zwei Jahre vergleicht. Ausgaben in Höhe von 300 Milliarden US-\$ pro Jahr sind veranschlagt. Der weltweite Fond zur

Bekämpfung von AIDS, Tuberkulose und Malaria (GFATM) ist ein erster Versuch, die Lücke zu schließen. Die finanzielle Unterstützung armer Entwicklungsländer durch neue Geldgeber wie die Gates Foundation ist außerdem von eminenter Bedeutung und müsste in der Zukunft weiter ausgebaut werden.

I.3 Aktuelle Probleme der Malariabekämpfung

Neben den ökonomischen Problemen ist die zunehmende Resistenzentwicklung als weiterhin wichtigste Hürde für die Bekämpfung der Malaria anzusehen. Südostasien weist die weltweit höchste Rate von Medikamentenresistenzen auf. Eine Verbreitung der dort beobachteten multiresistenten Plasmodien-Stämme nach Afrika würde zu einer humanitären Katastrophe führen (White et al., 1999). Die in letzter Zeit vermehrte Mobilität zwischen beiden Kontinenten (aktuell: wirtschaftliches Engagement asiatischer Länder auf dem afrikanischen Kontinent) erhöht die Bedrohung durch ein solches Szenario. Resistenzen gegen Chloroquin betreffen in Afrika bis zu 60%, jene gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin bis zu 20% der untersuchten Plasmodien-Stämme. Auch das klinische Versagen einer Behandlung mit Atavaquon bzw. Mefloquin wurde kurz nach deren Einführung beobachtet (Edwards und Biagini, 2006). Abb. 3 gibt einen Überblick über die Resistenz-Situation.

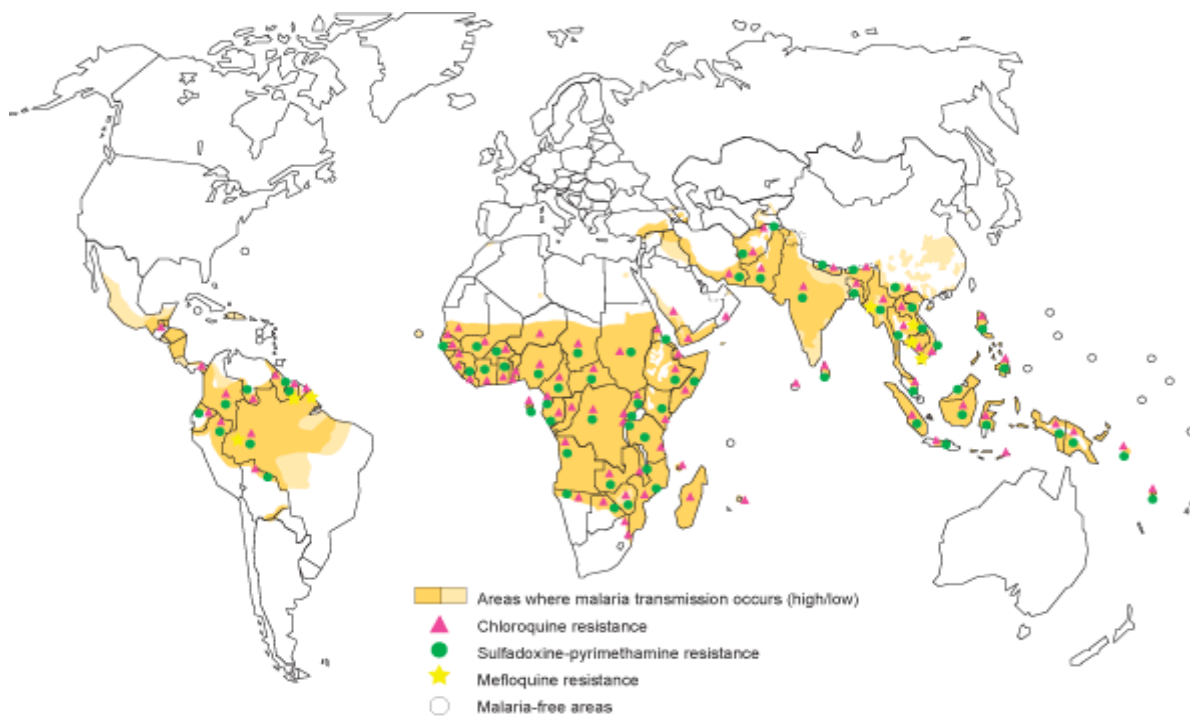


Abb. 3: Resistenzsituation weltweit

Veranschaulicht wird die globale Verteilung resistenter Plasmodien-Stämme.

Aus: The World Malaria Report 2005, World Health Organisation / UNICEF

Darüber hinaus kommen Umweltfaktoren für eine weitere Verbreitung der Malaria in Betracht. Die globale Erwärmung kann allgemein zu einem Anstieg der Inzidenz von Infektionskrankheiten führen (Khasnis und Nettleman, 2005). In besonderem Maße gilt dies jedoch für die Malaria (Patz und Olson, 2006; Pascual et al., 2006). Der Entwicklungszyklus des Parasiten im Moskitovektor verkürzt sich mit zunehmender Temperatur, weshalb die Mücken schneller infektiös werden (siehe Abb. 4). Außerdem können steigende Temperaturen besonders in Hochländern eine Überschreitung des Temperaturminimums für die Entwicklung der Plasmodien (für *P. falciparum* 18°C bzw. 15°C für *P. vivax*) bedingen und so zu einer Ausbreitung der Parasiten in einst malariafreie Gebiete führen.

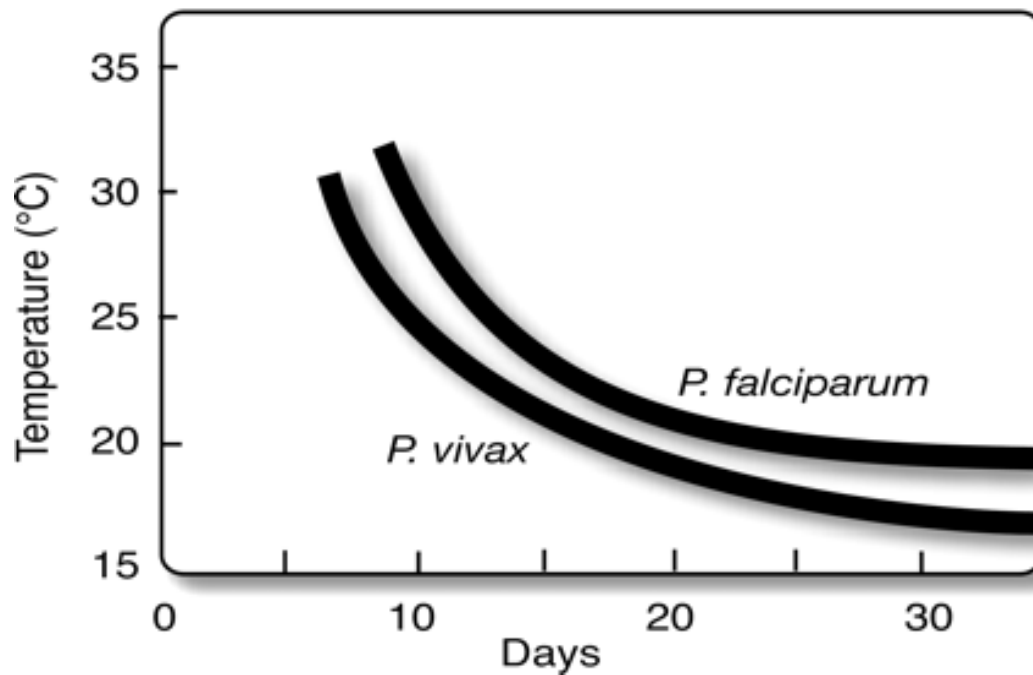


Abb. 4: Temperaturabhängigkeit des Plasmodien-Entwicklungszyklus

Dargestellt ist die Beziehung zwischen der Temperatur und der Zeit, welche die Plasmodien für ihren Entwicklungszyklus im Insektenvektor benötigen.

Skizze aus Patz et al., 2006

Die Moskitovektoren vermehren sich besser unter höheren Temperaturen. Dies ist durch eine Verkürzung des gonotrophischen Zyklus zu erklären (Warrell und Gilles, 2002). Bereits eine Erhöhung um 0,5°C kann zu einer Zunahme der Population um 30 – 100% führen.

Hieraus resultiert eine nicht geringe Gefahr für die Zukunft. Die Malaria konnte in gemäßigten Breiten aufgrund einer geringeren „Reproduktionsrate“ der Infektionen unter kühleren Temperaturen eliminiert werden. Durch klimatische Veränderungen sind diese Gebiete jedoch eventuell in kommenden Jahren von einem Wiederaufleben der Erkrankung bedroht.

Heftige Regenfälle und Fluten, welche im Zusammenhang mit verstärkten Zyklen von El Niño beobachtet werden, besitzen das Potential Malariaepidemien auszulösen (Patz und Olson, 2006; Brown et al., 1998).

Auch eine veränderte Landnutzung kann das Mikroklima beeinflussen und sich somit auf die Vermehrung der Moskitos auswirken. Unbewaldete Gebiete bzw. landwirtschaftlich genutzte Flächen (vormals Sümpfe) bieten *A. gambiae* bessere Brutbedingungen als Waldungen bzw. natürliche Feuchtgebiete. Abholzung und Kultivierung von Feuchtgebieten können auf diese Weise zusätzlich zu einer

Ausbreitung der Malaria, besonders in den Hochländern Afrikas, führen (Patz und Olson, 2006).

I.4 Genetische Manipulationsstrategien zur Eindämmung der Malaria

An der fortgesetzten weltgesundheitlichen und ökonomischen Belastung durch die Malaria wird sich durch den Einsatz konventioneller Methoden wohl auch in Zukunft nichts ändern. Zu vielschichtig sind die Hindernisse, welche hierfür überwunden werden müssten.

Deshalb scheint es unumgänglich, alternative Mittel zu erwägen, um das Problem zu kontrollieren. Seit längerem ist die Idee der genetischen Einflussnahme zur Bekämpfung von Seuchen oder gar Ausrottung derselben - ähnlich den Pocken - bekannt. Bereits frühzeitig kam der Gedanke auf, besonders durch Insekten übertragene Infektionen wie beispielsweise Malaria, Gelbfieber oder Dengue-Fieber durch genetische Manipulationen einzudämmen (Curtis, 1968; Knipling et al., 1968; Curtis und Graves, 1988; Hastings, 1994; Catteruccia et al., 2002; Ito et al., 2002; Franz et al., 2006).

Der aktuelle medizinische Nobelpreis für die RNA-Interferenz zeigt deutlich, wie erfolgversprechend ähnliche molekulargenetische Techniken für die Entwicklung neuer Behandlungs- bzw. Interventionsstrategien im Rahmen der Biomedizin sind (Fire und Mello, 1998). (Gleichwohl eignet sich die RNA-Interferenz nicht für die genetische Veränderung ganzer Populationen. Im Gegensatz zu Würmern wurde bei Säugern und Fliegen keine Vererbung des Mechanismus beobachtet [Zamore, 2006], welche für diesen Zweck jedoch vonnöten wäre. Deshalb und aufgrund der Notwendigkeit, auch neue Gene in die Zielorganismen einzuführen, werden für die genetische Manipulation natürlicher Populationen neue Interventionsinstrumente benötigt.)

Das „population genetic engineering“ genannte Verfahren versucht, eine natürliche Population durch eine neue, mit bestimmten Eigenschaften ausgestattete zu ersetzen. Dieses Ziel wird durch den populationsweiten Knockout bestimmter Gene bzw. die Einführung fremder „modifier“-Gene in eine bestimmte Population erreicht. Es wird beispielsweise versucht, bestimmte Krankheitserreger weniger schädlich für den Menschen zu machen oder gar auszurotten. Außerdem strebt man an, resistente Vektororganismen in der Natur zu etablieren (Ito et al., 2002; Franz et al., 2006).

Die Anwendung der beschriebenen Strategie erscheint im Zusammenhang mit insektenübertragenen Infektionskrankheiten besonders verheißungsvoll, da sich hierbei für die genetische Veränderung nicht nur der Krankheitserreger selbst, sondern wie bereits erwähnt auch der Vektororganismus anbietet. Aus verschiedenen Gründen ist es interessant, diesen Ansatz auf die Malariaproblematik zu übertragen: Zunächst handelt es sich wie dargestellt um eine der häufigsten infektionsbedingten Todesursachen. Außerdem haben zahlreiche Interventionsversuche in den vergangenen Jahrzehnten letztendlich keine Erfolge erzielen können, was die jährliche Mortalitätsrate betrifft. Im Gegenteil, aktuelle Untersuchungen können keine Reduktion der weltweiten Gesundheitsbelastung durch Malaria bestätigen (World Malaria Report 2005, World Health Organization). Schließlich sind in den letzten Jahren sowohl die Genome von *P. falciparum* (Gardner et al., 2002) als auch von *A. gambiae* (Holt et al., 2002), dem hauptsächlichen Überträger der Parasiten, sequenziert worden.

In letzter Zeit wurden zudem interessante Details über die Funktion der einzelnen Gene bekannt. Sowohl auf der Seite der Parasiten als auch der Vektoren bieten sich einige recht aussichtsreiche Ansatzpunkte für genetische Interventionen an. Es ist zunächst bedeutsam, dass ein Großteil der Erreger während ihres komplexen Entwicklungszyklus innerhalb des Vektors eliminiert wird. Einige Anopheles-Phänotypen sind sogar komplett resistent gegenüber dem Parasiten (Christophides et al., 2002; Michel und Kafatos, 2005; Niare et al., 2002; Menge et al., 2006; Riehle et al., 2006). In letzter Zeit wurden wesentliche Aspekte der zugrunde liegenden molekularen Interaktionen zwischen Wirt und Parasit erhellt. Auch hat man wichtige Erkenntnisse über die Pathophysiologie der lebensgefährlich verlaufenden Malariainfektion gesammelt. Hierdurch sind die Wege für eine effiziente genetische Modifikationsstrategie geebnet.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit werden zwei neuartige Konstrukte vorgestellt, welche vielleicht erstmals eine spezifische und effiziente Modifikation von natürlichen Plasmodien- bzw. Moskito-Populationen ermöglichen. Von der Entwicklung dieser Neuerungen ausgehend, wird eine komplexe genetische Manipulationsstrategie zur Bekämpfung der Malaria entworfen.

II. Material und Methoden

II.1 Bioinformatische Analysen

Die Genome von *Plasmodium falciparum* und *Anopheles gambiae* wurden in Reihenuntersuchungen ausgiebig auf target-Strukturen getestet, wobei Standardmethoden der Sequenzanalyse verwandt wurden, welche im Folgenden näher erläutert werden sollen. Auch das menschliche Genom wurde im Bezug auf den GPI-Syntheseweg analysiert, um diesen in *Plasmodium falciparum* zu humanisieren. Die Remodellierung des Synthesewegs erfolgte unter Zuhilfenahme von Protein- und Pathway-Datenbanken. Verschiedene durch Literaturrecherche ermittelte target-Gene wurden mithilfe diverser Datenbanken und bioinformatischer online-tools genauer untersucht. Stoffwechselwege wurden verglichen und rekonstruiert, wie in Dandekar et al., 1999 beschrieben. Die Verfahren zur Genomanalyse und Genomannotation wurden wie in Gaudermann et al., 2006 angewendet.

Homologie-Modellierung

Die Domänen der beteiligten Enzyme (z. B. AGPS und AGPAT1) wurden zunächst mit Pfam und SMART analysiert. Für beide Proteine konnten in anderen Spezies homologe Sequenzen mit bekannter dreidimensionaler Struktur gefunden werden. Die Homologiemodellierung wurde mit AnDom erreicht. (Eine zuerst durchgeführte Anfrage an den SWISS-MODEL Server brachte keine verwertbaren Informationen zu der räumlichen Struktur der Beispielenzyme, da die verwendeten templates den Anforderungen nicht genügten. AnDom hingegen erlaubt auch eine Analyse von Teildomänen, weshalb mit diesem Programm eine Strukturvorhersage gelang.) Als Vorlage (template) für AGPS diente der pdb entry 1e8g (Vanillyl-Alkohol Oxidase von *Penicillium simplicissimum*). Die genannte homologe Struktur ermöglichte es, die räumliche Struktur von AGPS (Länge: 684 AS) über einen Bereich von 555 Aminosäuren (AS) darzustellen. Pdb entry 1k30 (Glycerol-3-phosphat-1-acyltransferase von *Cucurbita moschata*) bildete die Vorlage für die Modellierung der Struktur von AGPAT1 (283 AS). Die Strukturvorhersage gelang für die Aminosäurereste 27 bis 267. Die graphische Aufbereitung der durch AnDom gewonnenen pdb entries erfolgte mit dem Visualisierungsprogramm RasMol (www.rasmol.org) von Roger Sayle.

Primäre Datenbanken

GenBank (NCBI)

Die GenBank (Benson et al., 2007; www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) in den USA ist ein Teil des NCBI (National Center for Biotechnology Information) und stellt eine der drei großen primären Datenbanken für Protein- und Nukleotidsequenzen dar. Das Entrez-System ermöglicht eine einfache Suche innerhalb der Datenbank nach verschiedenen Kategorien wie z. B. Zugangsnummer der Sequenz, Gen oder Organismus. Ein Sequenzeintrag in GenBank liefert neben der gesuchten Sequenz eine ausführliche Annotation derselben.

PlasmoDB

PlasmoDB (Kissinger et al., 2002; www.plasmodb.org) ist die offizielle Datenbank des Malaria Parasite Genome Project. Sie beinhaltet die Sequenzen von *Plasmodium falciparum* (strain 3D7), sequenziert vom Sanger Institute, TIGR/NMRC sowie von Stanford.

EBI (European Bioinformatics Institute)

Das EBI (www.ebi.ac.uk) ist eine nicht profitorientierte akademische Organisation des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und verwaltet biologische Datenbanken. Es wurden von uns unter anderem die komplett sequenzierten Genome von *Anopheles gambiae*, *Plasmodium falciparum* und *Homo sapiens* für die Blastsuche und für lokale Alignments in Sequenzvergleichen genutzt.

AnoBase

Aufgrund der guten Übersichtlichkeit nutzten wir auch AnoBase (Topalis et al., 2005; www.anobase.org). Es handelt sich um eine Datenbank, welche genomische Sequenzinformationen zu *Anopheles gambiae* verwaltet. Außerdem finden sich einige interessante Anwendungen wie z. B. ein tool, welches der Gensuche dient, und ein Direktzugang zu AnoXcel, der proteomischen Datenbank von *Anopheles gambiae*.

Domänen- und Motiv-Datenbanken

Pfam (Protein Families Database of Alignments and HMMs)

Pfam (Bateman et al., 2004; www.sanger.ac.uk/Software/Pfam) ist eine Sammlung von multiplen Alignments und den dazugehörigen Hidden Markov Modellen (HMMs) der wichtigsten Proteindomänen. Mithilfe von Pfam kann die Domänenstruktur eines Proteins ermittelt werden. Pfam besteht aus zwei Teilen, Pfam-A (gut charakterisierte Domänen) und Pfam-B (Domänen mit unbekannter Funktion).

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)

Diese Datenbank (Letunic et al., 2006; smart.embl-heidelberg.de) erlaubt ebenfalls die Domänenanalyse von Proteinen. Sie besteht aus den manuell erstellten Alignments und zugeordneten Hidden Markov Modellen (HMMs) von Domänen, welche in extrazellulären, signaltransduzierenden und chromatin-assoziierten Proteinen gefunden werden.

Strukturdatenbank

PDB (Protein Data Bank)

In der Protein Data Bank (Berman et al., 2000; www.rcsb.org/pdb) sind die 3D-Strukturdaten biologischer Makromoleküle niedergelegt (mehrere 1000 Strukturen). Über die Koordinaten der einzelnen Atome eines Proteins kann dessen räumliche Struktur konstruiert werden. Für die meisten Proteine ist keine experimentell ermittelte Struktur bekannt. Darum können homologe (genug Ähnlichkeit aufweisende) Proteine aus der 3D-Datenbank für Strukturvorhersagen genutzt werden (siehe Homologiemodellierung).

Datenbank-Suchalgorithmen

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Das von Altschul et al. (1990; 1997) entwickelte heuristische Verfahren ermöglicht es, Datenbanken innerhalb kurzer Zeit nach ähnlichen Sequenzen zu durchsuchen. Der Suchalgorithmus besteht aus drei Einzelschritten:

1. Zunächst wird die Suchsequenz in kurze Fragmente (Index) zerlegt, mit deren Hilfe in den Sequenzen der Datenbank ähnliche Fragmente gleicher Länge (Treffer) gesucht werden. Die Länge der Fragmente beträgt für DNA-Sequenzen 11 Nukleotide und für Proteine 3 Aminosäuren. Ein Treffer ist definiert durch einen Score (Ähnlichkeitsmaß), welcher einen bestimmten Schwellenwert übersteigt.
2. Hierauf muss in direkter Nachbarschaft ein zweiter Treffer gefunden werden.
3. Nun werden beide Treffer solange bidirektional verlängert, bis sich der Score nicht mehr erhöhen lässt. Ab einem definierten Schwellenwert werden die Treffer als high scoring pairs (HSPs) bezeichnet. Bei entsprechender Ähnlichkeit der Sequenzen können zwei HSPs durch Verlängerung auch verknüpft werden.

Standardmäßig wird meist BLOSUM62 als Substitutionsmatrix für das oben erwähnte Ähnlichkeitsmaß gewählt. (Annahme: Proteine mit durchschnittlich 62% Ähnlichkeit werden verglichen.)

Um die Scores der HSPs vergleichbar zu machen, werden diese normiert und nunmehr als Bit Scores bezeichnet. Die Qualität des Alignments ist umso besser, je höher der Bit Score ist. Da der Bit Score jedoch keine Aussage über die Signifikanz des Alignments erlaubt, wird ein weiterer Parameter berechnet: der Erwartungswert E. Je kleiner E, umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Alignment zwischen Such- und Datenbanksequenz auf reinem Zufall beruht. Die Ergebnisse der BLAST-Suche (Treffer) werden nach aufsteigendem E-Wert sortiert und bei niedrigen E-Werten (z. B. $E \leq 10^{-6}$) als Treffer akzeptiert.

BLAST bietet verschiedene Möglichkeiten der Sequenzsuche:

BLASTN: vergleicht eine Nukleotidsequenz mit einer Datenbank aus Nukleotidsequenzen

BLASTP: vergleicht eine Proteinsequenz mit einer Datenbank aus Proteinsequenzen

BLASTX: vergleicht eine Nukleotidsequenz (in allen Leserastern translatiert) mit einer Datenbank aus Proteinsequenzen

- TBLASTN:** vergleicht eine Proteinsequenz mit einer Datenbank aus Nukleotidsequenzen (in allen Leserastern translatiert)
- TBLASTX:** vergleicht die six-frame Translation einer Nukleotidsequenz mit der six-frame Translation einer Datenbank aus Nukleotidsequenzen
- PSI-BLAST:** Es handelt sich um eine iterative Erweiterung einer normalen BLAST-Suche. Nach einer einfachen BLAST-Suche wird aus den Treffern ein multiples Alignment gebildet und damit eine Konsensussequenz ermittelt. Mit dieser errechnet das Programm eine positionsspezifische Matrix, welche die Grundlage einer neuerlichen Suche bildet. Die Iteration kann erneut durchgeführt werden, wobei die neuen Treffer immer wieder in das multiple Alignment und somit auch in die neue positionsspezifische Matrix einbezogen werden. Schließlich konvergiert das Verfahren: keine neuen Sequenzen werden aufgedeckt, alle Sequenzen in der Datenbank sind gefunden. Durch diesen Such-Modus lassen sich im Besonderen entfernte Verwandte eines Proteins ermitteln.

Strukturvorhersageprogramme

AnDom

Mit diesem online tool (Schmidt et al., 2002; andom.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de) werden Proteinen in einzelnen Sequenzabschnitten strukturelle Domänen zugeordnet. Diese werden nach dem SCOP-Schema klassifiziert. Eine Strukturvorhersage ist somit auch für Teilstrukturen (s. Seite 11) möglich.

SWISS-MODEL Server

Auch Swiss Model (Schwede et al., 2003; swissmodel.expasy.org) kann die 3D - Struktur von Proteinen vorhersagen. Dies geschieht durch Alignment der Suchsequenz mit einer ausgewählten template-Sequenz, deren Struktur bekannt ist. Darauf kreiert der Server ein Homologie-Modell unter Anwendung von Energieminimierung (Gromos96) und WhatCheck (Test auf Qualität und Ausschluß sich überlappender Proteinstrukturen).

Pathway-Datenbanken und Pathway-Rekonstruktion

Enzyme

Die Enzyme-Datenbank (Bairoch, 2000; www.expasy.org/cgi-bin/enzyme-search-de) enthält vor allem Informationen bezüglich der Nomenklatur von Enzymen und basiert auf den Empfehlungen des Nomenklatur Komitees der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Außerdem werden in den über 4000 Einträgen die jeweilige E.C.-Nummer (*Enzyme Commission*) und die katalysierte Reaktion vermerkt. Des Weiteren finden sich Querverweise zu Sequenzeinträgen in SWISS-PROT und anderen Pathway- bzw. Motiv-Datenbanken.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

In dieser Datenbank (Kanehisa et al., 2002; www.genome.ad.jp/kegg) erhält der Nutzer eine graphische Auflösung aller metabolischen und regulativen Prozesse der Zelle. Zu jedem Eintrag werden sowohl ein Referenz-Pathway als auch verschiedene spezie-spezifische Pathways aufgelistet. Hierbei finden sich Verknüpfungen zu den beteiligten Genen, Substraten und Cofaktoren.

PlasmoDB (s. Seite 11)

II.2 Mathematische Modellierung

Die vorliegende Arbeit orientierte sich zunächst an den Berechnungen, welche bereits von A. Burt (2003) durchgeführt wurden. Der erwähnte Artikel enthält Kalkulationen bezüglich der Ausbreitungstendenzen verschiedener HEG-Konstrukte bzw. Gene, die mithilfe von HEGs eingeführt werden, in natürlichen Populationen. Im Besonderen werden auch die Populationskontrolle bzw. die Möglichkeit der Ausrottung natürlicher Populationen mithilfe von HEGs, welche rezessive letale Knockouts induzieren, durch Fitnesskalkulationen mathematisch beschrieben. Die Protokolle von Burt werden auf die Populationsdynamik der in dieser Arbeit behandelten drive-Systeme angewandt und auf natürliche Populationen von *Anopheles gambiae* bzw. *Plasmodium falciparum* bezogen.

Des Weiteren wurde eine eigene Näherungsformel für population-engineering-Strategien, welche nicht die Ausrottung der ursprünglichen Population einschließen, entwickelt. Mit diesem Formalismus lässt sich die Frequenz der vorgeschlagenen

Konstrukte in Abhängigkeit von der Anzahl abgelaufener Generationszyklen abschätzen.

Alle Berechnungen wurden auf einem Standard-PC durchgeführt.

II.3 Molekularbiologische Techniken

Zwar handelt es sich prinzipiell um eine bioinformatische Arbeit, doch führte die Entwicklung konkreter drive-Systeme zur praktischen Umsetzung der erarbeiteten Theorie. Derzeit wird die Klonierung und detaillierte Erprobung der Konstrukte im Biozentrum der Universität Würzburg in Zusammenarbeit mit Professor Roy Gross (Lehrstuhl für Mikrobiologie) umgesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Klonierungsstrategie mit den hierfür notwendigen Laborprotokollen formuliert.

Hierbei orientierten wir uns vor allem an dem einschlägig bekannten Standardwerk *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol. von Joseph Sambrook und David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Januar 2001), Cold Spring Harbor, N.Y. Das Buch enthält ausführliche Informationen zu den einzelnen notwendigen Arbeitsschritten. Von besonderem Interesse waren unter anderem die Kapitel zu Oligodesign, PCR, Expressionssystemen und Transformation.

III. Resultate

III.1 Analyse und Erarbeitung der Grundlagen für die Implementierung der neuen Strategien

III.1.1 Resistenz-Kalkulationen

Der Einsatz von antiparasitären Medikamenten bzw. Insektiziden und Vakzinen führt bekanntermaßen zu einer raschen Resistenzentwicklung, welche zunehmend den Erfolg solcher konventionellen Strategien gefährdet. Dieses Problem ist mathematisch vorhersehbar und soll durch exemplarische Rechnungen veranschaulicht werden:

Es wurde von Iwasa et al., 2003 ein mathematischer Formalismus entwickelt, welcher Voraussagen über die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Resistenzen gegenüber pharmakologischen Therapien oder Impfungen erlaubt. Diese Theorie

legen wir zugrunde, um das Problem der Resistenzentwicklung bei *P. falciparum* zu veranschaulichen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes Therapieregime bei einem einzelnen Patienten Erfolg hat, wird ausgedrückt durch

$$P = \exp(-NC_n u^n z)$$

if $R_{11} \gg 1$ then $z \approx 1$

N steht für die Parasitenzahl, welche sich entweder zu Beginn der medikamentösen Therapie im Organismus des Patienten findet (für diesen Fall setzen wir $N = 2,5 \cdot 10^{11}$) oder welche maximal in einem geimpften Organismus erreicht wird (im Folgenden sei hierbei $N = 2,5 \cdot 10^7$, s. u.).

n Mutationen werden für die Entstehung der escape-Mutante benötigt.

u beschreibt die Mutationsrate, welche wir gleich $3 \cdot 10^{-8}$ setzen.

Der Risiko-Koeffizient C lässt sich für den Fall, dass die Punktmutationen in einer beliebigen Reihenfolge auftreten, folgendermaßen errechnen:

$$C_n = \sum_{i=0}^n \binom{n}{i} f_{n-i}(a) f_i(b)$$

Alle Genotypen außer der escape-Mutante besitzen während der Therapie dasselbe Reproduktionsverhältnis, $R < 1$.

Alle Mutanten außer dem Wildtyp weisen vor der Therapie dieselbe relative Fitness, $w < 1$, auf.

Sei $a = R/(1 - R)$ und $b = 1/(1 - w)$

Falls der escape-Genotyp nur über eine bestimmte Reihenfolge der notwendigen Punktmutationen zustande kommt, muss die Berechnung des Risiko-Koeffizienten adaptiert werden:

$$C_n = [a^2(1+a)^{n-1} - b^2(1+b)^{n-1}] / (a-b)$$

Für diese Bedingung sind die Ergebnisse der folgenden Berechnungen in Blau dargestellt.

Die Funktion f ist rekursiv definiert als

$$f_0(x) = 1,$$

$$f_i(x) = x \sum_{j=0}^{i-1} \binom{i}{j} f_j(x)$$

Resultate:

1. Eine Punktmutation bedingt bereits den escape-Genotyp:

Selbst wenn wir eine Optimaltherapie ($w = 0$; $R = 0$) annehmen, versagt diese theoretisch bei jedem behandelten Patienten ($P = 0$), da in jedem Fall resistente Parasiten auftreten.

2. Zwei Punktmutationen sind für das Zustandekommen des escape-Genotyps verantwortlich:

Zwar liefert eine Optimaltherapie für diesen Fall günstige Ergebnisse ($P = 0,9993$ bzw. $P = 0,9996$), doch sind die Prämissen hierfür kaum als realistisch anzusehen. Besetzt man die Parameter w (relative Fitness) und R (Reproduktionsverhältnis) mit den realistischeren Werten $0,9$ bzw. $0,5$, verringert sich die Wahrscheinlichkeit eines individuellen Behandlungserfolgs bereits auf 95% bzw. 97% , d. h. die Therapie versagt in jedem zwanzigsten Fall, wobei die Therapieversager zur Ausbreitung der nunmehr resistenten Parasiten führen können.

3. Drei Punktmutationen bedingen den escape-Genotyp:

Diese Ausgangssituation lässt die Entstehung resistenter Genotypen in einem Patienten unter Zugrundelegung obiger Prämissen ($w = 0,9$; $R = 0,5$) theoretisch überaus unwahrscheinlich erscheinen ($P = 0,99999995$ bzw. $P = 0,999999991$). Dennoch ist auch diese mathematisch errechnete Sicherheit trügerisch, worauf wir jedoch weiter unten eingehen werden.

Für einen nur suboptimalen Impfschutz gleichen die Ergebnisse denen, welche für eine pharmakologische Intervention erörtert wurden. Postuliert man eine – bisher nicht in Aussicht stehende - hocheffiziente Impfung, geht dies mit deutlich veränderten Konsequenzen für den Interventionserfolg einher. (Selbst für eine wirkungsvolle Impfung ist keine resultierende sterile Immunität der behandelten Patienten zu erwarten. Deshalb definieren wir den erreichten Schutz durch eine Plasmodienlast von lediglich $2,5 \cdot 10^7$. Dieser Wert entspricht der maximalen Parasitämie, bevor das Immunsystem die Erreger eliminiert.) Nichtsdestotrotz wäre diese Immunisierung nahezu wirkungslos, wenn eine einzige Punktmutation die Plasmodien resistent machen könnte. Die Impfung würde in jedem zweiten Fall

versagen ($P = 0,47$). Wird der escape-Genotyp durch zwei Punktmutationen erreicht und nehmen w und R Werte von 0,9 bzw. 0,5 an, so liegt die Wahrscheinlichkeit für einen individuellen Impferfolg schon bei 0,999995 bzw. $P = 0,999997$. Dieser würde also lediglich bei jedem zweihunderttausendsten Patienten ausbleiben. Die Gefahr der Ausbreitung resistenter Parasiten auf dem Boden eines solchen singulären Fehlschlags ist als äußerst gering, jedoch nicht unmöglich einzuschätzen.

Dennoch ist auch in diesem Fall nicht unbedingt auf die optimistischen Kalkulationen zu vertrauen: Die rasche Resistenzentwicklung (insbesondere auch in Bezug auf Artemisinine, siehe Diskussion) beweist leider, dass die vermeintliche Sicherheit vor escape-Mutanten, welche die Kalkulationen zumindest unter Voraussetzung multipler Punktmutationen suggerieren, trügerisch ist. Diese Tatsache stimmt mit einer wichtigen Einschränkung der Formeln überein: Rekombinationsmechanismen werden nicht berücksichtigt. Plasmodien pflanzen sich jedoch zumindest in ihrem Insektenvektor sexuell fort.

Außerdem ist zu berücksichtigen, dass Allelvarianten innerhalb einer Population von Parasiten überaus häufig sind. Die meisten Patienten werden darüber hinaus mit verschiedenen Klonen infiziert. Auf diesen Tatsachen beruht die Möglichkeit von rasch aufkommenden genetischen Rekombinationen und die Entwicklung neuer Genotypkombinationen (Warrell und Gilles, 2002).

Somit erklären sich die beobachtete Entstehung von seltenen multiplen Mutationsereignissen und die darauf beruhenden Resistenzen selbst gegenüber initial hocheffektiven Kombinationspräparaten.

Des Weiteren führt die Haploidie des parasitären Genoms zu einer sofortigen Fixierung der entstandenen Resistenzen.

Aufgrund der geschilderten Hindernisse konventioneller Ansätze und der sich daraus ergebenden Schwierigkeit, die Malaria auch in heutigen Hochendemiegebieten einzudämmen, werde ich im Weiteren alternative genetische Eingriffsmöglichkeiten und damit zusammenhängende innovative Technologien für die Bekämpfung der Seuche erörtern, welche ich im Rahmen meiner Dissertationsarbeit entwickelte.

Zwar wurde der Nutzen genetischer Manipulationen in der Malariabekämpfung seit langem erwogen und wiederholt diskutiert, doch konnte auf diesem Gebiet bisher kein durchschlagender Erfolg verzeichnet werden. Man sah sich allgemein in Hinblick

auf die Manipulation natürlicher Populationen mit einer Reihe kaum zu überwindender Probleme konfrontiert. Zunächst ist festzustellen, dass sich genetische Modifikationen in natura ohne den Einsatz eines effizienten drive-Mechanismus nicht fixieren lassen (Sinkins und Gould, 2006). Auf der anderen Seite mindern jedoch die mögliche evolutionäre Instabilität der verwendeten drive-Mechanismen (z. B. transposable elements) und der mögliche Schaden (z. B. durch Insertionsmutagenese oder chromosomale Umlagerungen durch Rekombinationsmechanismen), welche sie dem Wirtsorganismus zufügen können, meist die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Mutanten in einer natürlichen Population durchsetzen können. Kürzlich wurde das letztgenannte Problem leider auch in einem viralen Gentherapieansatz offenbar. Die X-chromosomal vererbte Form der Schwere Kombinierten Immundefizienz (X-SCID) wurde mittels Gentherapie behandelt. Es zeigte sich, dass aufgrund retroviraler Integrationsereignisse onkogene Signalwege aktiviert und dadurch akute Leukämien ausgelöst werden können (Kaiser, 2003; Nienhuis et al., 2006).

III.1.2 Homing-Endonuclease-Gene

Die Suche nach einer Lösung für die genannten Probleme rückte die Gruppe von ortsspezifischen egoistischen Genen (site-specific selfish genes) in den Fokus unseres Interesses. Sie schienen uns sehr geeignet, um unsere weiter unten (Kapitel III. 4) beschriebenen genetischen Strategien zur Bekämpfung der Malaria effizient umzusetzen.

Ortsspezifische egoistische Gene besitzen die Fähigkeit, sich in bestimmte Zielsequenzen des Wirtsgenoms hineinzukopieren und bedingen deshalb nicht jene Probleme, welche eine ortsunspezifische Genmanipulation mit sich bringt und diese oft zum Scheitern verurteilt. Da Homing-Endonuclease-Gene (HEG) unter allen ortsspezifischen egoistischen Genen den einfachsten Transpositionsmechanismus besitzen, werden sie auch an erster Stelle Gegenstand der Diskussion sein.

HEGs sind natürlicherweise vorkommende Gene, welche die Fähigkeit besitzen, sich in bestimmte Sequenzen der Wirts-DNA hineinzukopieren und sich dadurch, unter Umgehung der Mendel'schen Vererbungsregeln, rasch in Populationen auszubreiten. Ihre Mobilität beruht sowohl auf den Eigenschaften des Proteins (Homing-Endonuclease), welches durch das HEG kodiert wird und welches DNA-

Endonuclease-Aktivität besitzt, als auch auf dem rekombinatorischen DNA-Reparaturmechanismus der Wirtszelle (Chevalier und Stoddard, 2001).

Die Transposition des mobilen Introns wird als „Homing“ bezeichnet, da der Ziellokus in der Sequenz mit dem Ausgangslokus, in welchen das Intron zunächst eingefügt ist, identisch ist. Nach der Translation der durch die Intron-RNA kodierten Homing-Endonuclease erkennt und schneidet dieses Enzym eine 20-30 Basenpaare lange Sequenz auf Chromosomen, welche das mobile Intron nicht enthalten. Das mobile Intron ist seinerseits in der Mitte seiner eigenen Erkennungssequenz angeordnet. Aus diesem Grund werden Chromosomen, welche bereits über eine Kopie des Introns verfügen, nicht von der Homing-Endonuclease erkannt und geschnitten. Die Kontinuität des intronlosen, nunmehr zerbrochenen Chromosoms wird hierauf durch das zelleigene rekombinatorische DNA-Reparatursystem wiederhergestellt. Hierbei fungiert das intakte homologe Chromosom, welches bereits das Intron enthält, als Matrize. Nach Beendigung der Reparatur besitzen folglich beide Chromosomen eine Kopie des mobilen Introns, d. h. eine heterozygote Zelle wandelt sich in eine homozygote um (Chevalier und Stoddard, 2001; Burt, 2003).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Homing-Endonucleasen in verschiedenen Bakterien-, Pflanzen-, Insekten- und Säugerzellen funktionsfähig sind, d. h. sie erkennen und schneiden in besagten Zellen ihre spezifische Erkennungssequenz (Seligman et al., 1997; Donoho et al., 1998; Posfai et al., 1999; Monnat et al., 1999; Kirik et al., 2000; Rong und Golic, 2000). Besonders bei *D. melanogaster* konnten hierdurch auch Reparaturmechanismen ausgelöst werden (Rong und Golic, 2000; Bellaiche et al., 1999; Rong et al., 2002).

Seit kurzem ist es möglich, computergestützt HEGs zu kreieren, welche bestimmte neue target-Sequenzen erkennen und schneiden (Ashworth et al., 2006). Diese Möglichkeit steigerte den praktischen Nutzen der Gene erheblich.

Bereits früher wurden einige erfolgversprechende Versuche unternommen, Enzyme mit neuer target-Spezifität herzustellen (Chandrasegaran und Smith, 1999; Segal et al., 1999; Bibikova et al., 2001; Buchholz und Stewart, 2001; Chevalier et al., 2002; Santoro und Schultz, 2002; Seligman et al., 2002; Takahashi und Fujiwara, 2002; Saraf-Levy et al., 2006; Rosen et al., 2006).

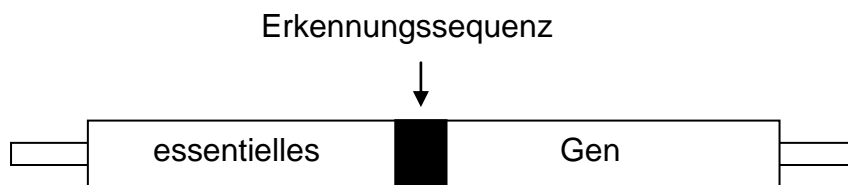
Die Effizienz und die theoretischen Anwendungsmöglichkeiten dieser neuen genetischen „Werkzeuge“ wurden von Austin Burt (Burt, 2003) umfassend diskutiert und sollen im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Die verschiedenen Strategien der genetischen Manipulation natürlicher Populationen können prinzipiell nach ihrem Ziel in zwei Gruppen eingeteilt werden:

1. Die Kontrolle der Größe bzw. im Extremfall die Ausrottung einer bestimmten Population.
2. Die Veränderung von Eigenschaften einer anvisierten Zielpopulation, d. h. population genetic engineering.

Burt stellt die erstgenannte Maßnahme in den Vordergrund, weshalb sie auch zunächst erörtert werden soll. Er schlägt folgendes Konstrukt vor (Abb. 5):

vor dem Homing-Prozess



nach dem homing-Prozess

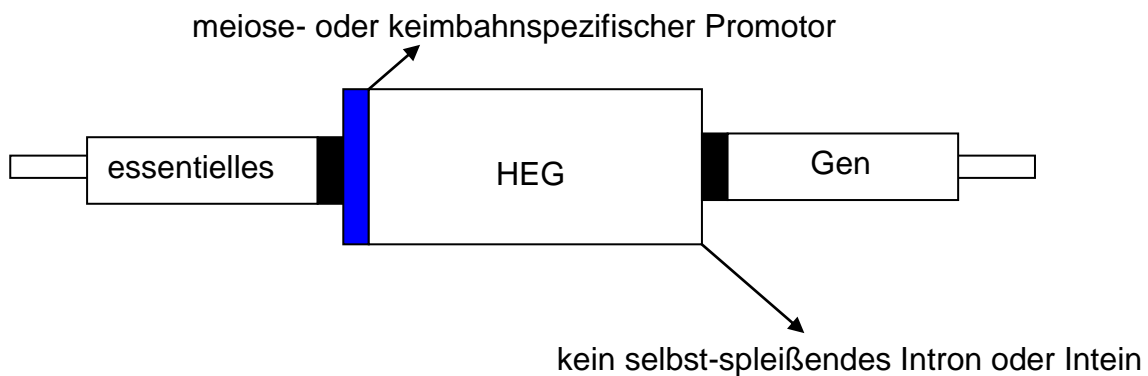


Abb. 5: Homing-Endonuclease-Gen-Konstrukt

Gezeigt ist der Ziellocus der Homing-Endonuclease vor und nach der Integration der mobilen DNA, welche über einen meiose- oder keimbahnspezifischen Promotor exprimiert wird (Strategie nach Burt, 2003).

a) Das HEG ist von dem es normalerweise beherbergenden Gruppe-I-Intron getrennt, d. h. das Gen liegt „nackt“ vor. Der Grund hierfür ist folgender:

Natürlicherweise vorkommende HEGs unterbrechen ihre Wirtsgene nicht funktionell, da sie nach der Transkription des betreffenden DNA-Abschnitts mit dem selbstspleißenden Intron aus der RNA entfernt werden. Durch die alleinige Verwendung der Homing-Endonuclease-Gene ohne flankierende Intron-Sequenzen bei der genetischen Manipulation ergibt sich demnach eine suffiziente Unterbrechung des anvisierten Wirtsgens.

b) Das HEG ist so konstruiert, dass es eine target-Sequenz innerhalb eines essentiellen Gens erkennt und schneidet. Das HEG selbst ist in der Mitte seiner eigenen Erkennungssequenz angeordnet. Es ist darauf zu achten, dass der entstehende Knockout rezessiv ist, d. h. kaum Beeinträchtigung der Fitness im heterozygoten Zustand bedingt, sich aber bei Homozygotie tödlich auswirkt.

c) Außerdem steht das HEG unter der Kontrolle eines meiose- oder keimbahnspezifischen Promotors. Hierdurch entwickeln sich die heterozygoten Zygoten normal, geben aber das HEG und damit den Knockout im Idealfall (falls Transpositionsfrequenz = 1) an alle ihre Nachkommen weiter. Im Vergleich dazu betrüge die Häufigkeit des neuen Genotyps bei Mendel'scher Vererbung nur 50 Prozent.

Durch die Verwendung des beschriebenen Konstrukts würde der Knockout zunächst vorwiegend im heterozygoten, also lebensfähigen Zustand vorkommen und somit aufgrund seiner „Super-Mendel'schen“ Vererbung stets an Häufigkeit zunehmen. Nach einer gewissen Generationenzahl würden jedoch auch zunehmend homozygote, nicht lebensfähige Individuen entstehen, was schließlich zu einer Ausrottung oder wenigstens deutlichen Dezimierung der Population führen sollte. Durch Simulationen konnte gezeigt werden, dass ein Zeitraum von weniger als 20 Generationen notwendig ist, um eine genetic load (unproduktiver Populationsanteil, d. h. lebensunfähiger Homozygotenanteil) zu erreichen, welche genügt, um eine Zielpopulation stark zu dezimieren.

Durch differenziertere Ausführungsformen der genetischen Intervention lässt sich sogar noch eine weitere Steigerung der genetic load erreichen:

1. Zunächst können effizientere target-Gene in Betracht gezogen werden: So hat beispielsweise ein Knockout, welcher Weibchen oder Männchen unfruchtbar macht, verglichen mit einem rezessiven letalen Knockout, eine dreimal so hohe Fitnessminderung zur Folge. Die Etablierung einer „enkellosen“ Mutation

(homozygote Weibchen haben lebensfähige, aber unfruchtbare Nachkommen) erhöht die Effizienz gar um den Faktor 60 (Burt, 2003).

2. Eine einfache Art der Systemoptimierung ist die gleichzeitige Anvisierung verschiedener essentieller loci im Zielgenom. Hierdurch lässt sich der Effekt der Intervention im Idealfall potenzieren.

Insbesondere sei als charakteristisches Merkmal dieser genetischen Manipulation ihre vollkommene Reversibilität hervorgehoben (nachträglicher Populationsschutz). Diese wird durch die Einführung eines funktionsgleichen Allels des Zielgens erreicht, welches von dem HEG nicht erkannt wird. Hierzu kann die Degeneration des genetischen Codes oder am einfachsten eine Inversion des target-Gens genutzt werden.

Des Weiteren zeichnen sich HEGs im Gegensatz zu anderen Gen-Konversionselementen durch eine verlässliche evolutionäre Stabilität aus. Beispielsweise werden Mutationen, die ein HEG verursachen, welchem die Fähigkeit abgeht, die Zielsequenz in der DNA zu erkennen, ausselektiert. Ursächlich hierfür ist, dass in diesem Falle der Schaden, welche das HEG dem Wirt zufügt, gleich bleibt, der Selektionsvorteil durch einen „Super-Mendel’schen“ Vererbungsmodus jedoch verloren geht.

Ein größeres Problem stellen natürliche Resistenzen durch funktionsfähige Varianten des Zielgens dar, welche von dem HEG nicht erkannt werden. Gleichwohl gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von escape-Mutanten zu minimieren:

1. Man wird target-Sequenzen auswählen, deren Aminosäuresequenz sich nicht ändern kann, ohne dass dadurch die Genfunktion verloren geht.
2. Die targets sollten eine geringe Variabilität innerhalb der Zielpopulation aufweisen. Insbesondere dürfen keine funktionsfähigen Längenvarianten vorliegen.
3. Es können verschiedene HEGs eingesetzt werden, um gleichzeitig
 - a) verschiedene Sequenzen innerhalb eines Gens
 - b) verschiedene Genezu attackieren.

Bereits eingangs wurde eine gegenüber der gezielten Reduktion einer Schädlingspopulation subtilere Strategie erwähnt, nämlich ein population-genetic-

engineering-Verfahren: Hierbei wird eine genetische Transformation mit dem Resultat einer weniger schädlichen Population angestrebt.

Es ist hierbei von Bedeutung, dass sich ein solches Konstrukt auch dann ausbreiten wird, wenn es eine gewisse Beeinträchtigung des Wirts mit sich bringt. Dies ist der Fall, solange die Fitness der homozygoten Mutanten $1/(e + 1)$ übersteigt (e gibt hierbei die Wahrscheinlichkeit an, dass sich ein HEG⁻ Allel in einer heterozygoten Zelle in HEG⁺ verwandelt, d. h. man könnte dies also als Transpositionsfrequenz bezeichnen). Ein einfaches Beispiel möge den letztgenannten Umstand verdeutlichen: Bei einer konservativen Schätzung von $e = 0,9$ dürfte die Fitness der homozygoten Mutanten bis auf einen Wert von ca. 0,55 absinken, wobei sich die Mutanten dennoch ausbreiten würden.

Neben den wichtigen ethischen Vorzügen bietet diese Interventionsform darüber hinaus den eklatanten logischen Vorteil, dass resistente Genotypen weniger stark selektiert werden. Bei einem Eradikationsversuch ist das Auftreten eines resistenten Zielgens quasi gleichzusetzen mit dem Scheitern des Vorhabens, weil das Konstrukt konsekutiv verdrängt wird. Nicht so beim population engineering, da die genetische Transformation die Trägerorganismen zumindest nicht signifikant beeinträchtigen sollte.

Grundsätzlich lassen sich drei verschiedene genetische Modifikationen unterscheiden:

1. der Knockout eines unerwünschten Gens
2. der Ersatz eines bestimmten Gens durch eine bevorzugte Variante desselben Gens
3. die Einführung eines neuen Gens.

Wie oben (Seite 24) erwähnt, kann ein Knockout durch die Einführung eines Allels, welches von der Homing-Endonuclease nicht erkannt wird, rückgängig gemacht werden.

Dasselbe gilt ebenso für ein neu eingeführtes Fremdgen, indem man ein HEG einsetzt, welche das Fremdgen erkennt und schneidet. Somit ist auch das population genetic engineering als prinzipiell vollkommen reversibler Eingriff zu gestalten.

Im Verlauf meiner Arbeit stellte ich fest, dass das von Burt vorgeschlagene Konstrukt so, wie von ihm skizziert (Burt, 2003), nicht zum Zwecke der Elimination bzw. Kontrolle natürlicher Schädlingspopulationen funktionieren kann. Diese Art der

Populationskontrolle stellt jedoch einen vieldiskutierten und wichtigen genetischen Ansatz zur Eindämmung der Malaria dar (Sinkins und Gould, 2006). Deshalb wurde das beschriebene Konstrukt von uns verbessert und zum Patent angemeldet¹.

Im Weiteren sollen nun die Mängel des im oberen Abschnitt dargestellten Konstrukts aufgezeigt und das neue Gen-Konversionskonstrukt kurz veranschaulicht werden.

III.2 Ein neues Gen-Konversionskonstrukt und Verfahren zur Vererbung von Genmobilität

Burt stellt in seinen Ausführungen fest, dass es besonders für die gezielte Elimination von Schädlingspopulationen bzw. die Kontrolle der Populationsgröße notwendig ist, den Prozess des „Homings“ auf bestimmte Zeitpunkte zu beschränken (s. o.). Diese essentielle Voraussetzung ist jedoch für das von ihm vorgestellte Konstrukt nicht gegeben.

Durch Einführung eines spezifischen Promotors steht das HEG zwar unter dessen Kontrolle, jedoch auch unter der eines weiteren Promotors, welcher normalerweise die Transkription des zu unterbrechenden Wirtsgens kontrolliert. Der Grund hierfür ist folgender: Ein Promotor (in diesem Falle der neu eingeführte spezifische) beendet die Transkription nicht.

Aufgrund dieses Mangels wären alle betroffenen Individuen, welche das Konstrukt trügen, alsbald homozygot den Knockout betreffend und somit im Allgemeinen lebensunfähig. Deshalb könnte sich das Konstrukt kaum oder gar nicht in einer Population ausbreiten.

Wir erzielten die zeitliche Beschränkung des Homing-Vorgangs mit dem folgenden molekularbiologischen Konstrukt (siehe auch Abb. 6):

Das HEG wurde unter die Kontrolle eines spezifischen Promotors gestellt und in der Intronsequenz belassen. Außerdem beendeten wir die Transkription stromaufwärts

¹ Aus Prioritätsgründen baten wir die Universität Würzburg, die Erfindung für eine private Anmeldung freizugeben, da die notwendige Prüfung durch BayernPatent – welche bereits für eine weitere Anmeldung erfolgt war (siehe nächstes Kapitel) – die Einreichung stark verzögert hätte. Nachdem unserem Anliegen stattgegeben worden war, reichten Professor Dandekar und ich die Anmeldung (Aktenzeichen 10 2006 029 354.1) unabhängig von der Universität ein.

des spezifischen oder auch induzierbaren Promotors durch einen Terminator der Transkription. Durch diesen weiteren wichtigen Schritt steht das HEG und dadurch der Prozess des „Homings“ (Genkonversion) nicht mehr unter der zusätzlichen Kontrolle des Promotors, welcher normalerweise die Transkription des zu unterbrechenden Wirtsgens kontrolliert. Durch die Wahl eines geeigneten spezifischen Promotors kann somit das „Homing“ durch dessen spezifische Aktivierung auf frei wählbare Zeiträume beschränkt werden. Je nach dem Zweck, welchen der genetische Eingriff erfüllen soll, kann der Fachmann einen solchen Promotor mit Programmen wie „tess“ (<http://www.cbil.upenn.edu/tess/>, Schug, 2003) oder etwa dem „Genomatix“ System (Werner, 2003) leicht ausfindig machen.

Außerdem entsteht durch Einführung des Terminators der Transkription eine suffiziente Unterbrechung des Wirtsgens.

In Abb. 6 ist eine mögliche Ausführungsform des Konstrukts dargestellt. Sie zeigt das neue Gen-Konversionskonstrukt bereits in einen Vektor eingefügt.

a) Das Intron wird mit Restriktionsendonucleasen gespalten, und das Konstrukt wird mittels PCR und Ligation hergestellt. Das Konstrukt besteht aus dem Gruppe-I-Intron (siehe z. B. Genes VIII Lewin, 2004), welches durch Frequenzen flankiert wird, die zu einer zellulären Zielsequenz homolog sind. Aufgrund dieser Sequenzen kann das Konstrukt durch Rekombination in den Ziellokus eingefügt werden. Innerhalb des Introns findet sich ein HEG, welches unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors steht (spezifisch für Meiose, Keimzellstadium oder bestimmte Entwicklungs- bzw. Differenzierungsstadien oder durch bestimmte Substanzen induzierbar). Die Transkription wird stromaufwärts des spezifischen Promotors durch einen Terminator der Transkription beendet.

b) Das Konstrukt wird in einen Standard-Eukaryonten-Klonierungsvektor, welcher bei einschlägig bekannten Anbietern wie z. B. New England Biolabs oder Promega Biotech erworben werden kann, integriert. Der Vektor verfügt außerdem über einen Selektionsmarker für eukaryonte Zellen (z. B. Hygromycin-Resistenzgen). Standard-Klonierungstechniken sind dem Fachmann bekannt, siehe „PCR“ von M. J. McPherson, S. Moller Springer-Verlag Telos (Oktober 2000) oder Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol. von Joseph Sambrook und David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Januar 2001), Cold Spring Harbor, N.Y.

c) Das Vektorkonstrukt wird mittels Elektroporation in die Zielzelle eingeführt. Das Gen-Konversionskonstrukt wird durch Rekombination in die Ziel-Sequenz eingefügt.

Mit Hilfe des Selektionsmarkers können zunächst plasmidtragende Zellen selektiert werden. Danach werden heterozygote Transformanten (Zellen bei denen sich das Gen-Konversionskonstrukt, an der richtigen Stelle in die Zielsequenz integriert, auf einem Chromosom befindet) mittels southern blot identifiziert.

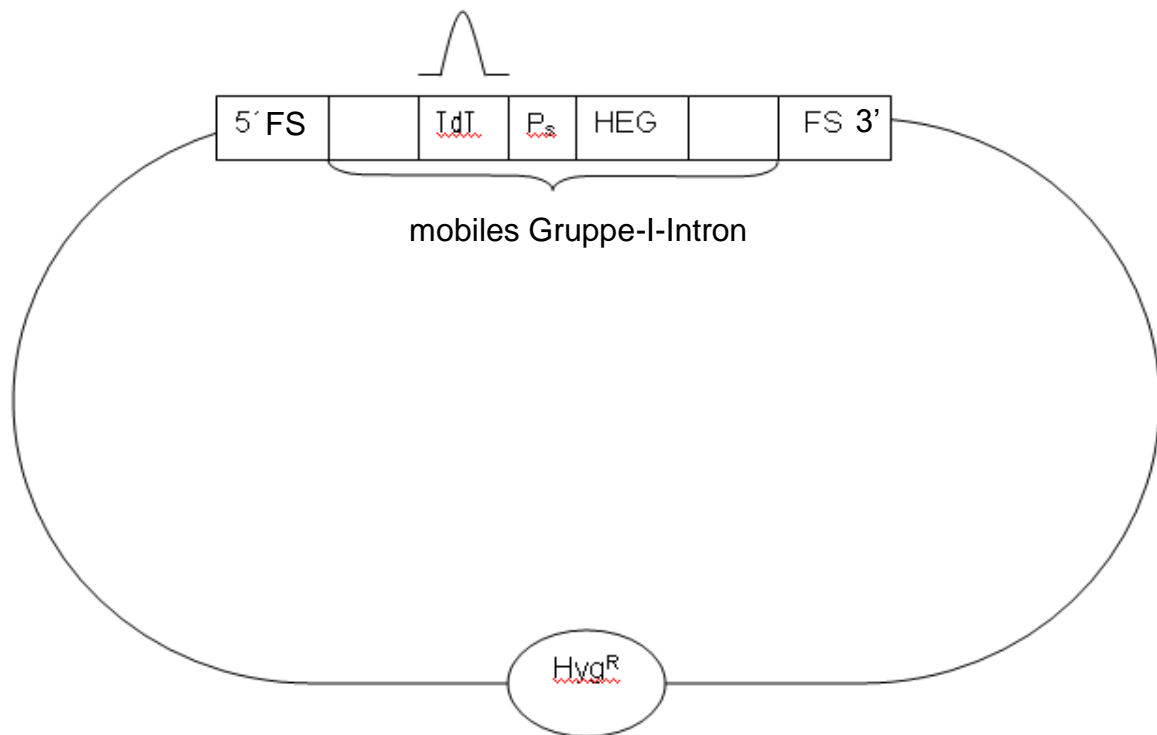


Abb. 6: Skizzenhafte Illustration des Gen-Konversionskonstruktes

Beispielhaft sind GenBank (Benson et al., 2007) -Identifikationsnummern (GI) angegeben, die durch funktionell homologe Sequenzen ersetzt und an pro- bzw. eukaryonte Expressionssysteme adaptiert werden können. Ein Standardvektor wird im Ausführungsbeispiel genutzt und wie folgt modifiziert:

HEG: modifiziertes Homing-Endonuclease-Gen, welches die Zielsequenz erkennt (z. B. modifizierte Homing-Endonuclease I-Crel)

Ps: spezifischer Promotor (z. B. GI:6323781 oder GI:45552753)

TdI: Terminator der Transkription mit stem-loop-Struktur (z. B. GI:9626243)

FS: Flankierende Sequenzen für Rekombination

Hyg^R: Selektionsmarker, in diesem Fall Hygromycin-Resistenzgen (z.B. GI:2168575)

Die möglichen Anwendungsbereiche des vorgestellten Konstrukts beschränken sich bei weitem nicht auf das bereits erwähnte Populationsengineering. Eine differenzierte Ausführung des praktischen Potentials des vorgestellten Gen-Konversionskonstrukts werde ich weiter unten (im Rahmen der Darstellung der zweiten, von BayernPatent geförderten Patentanmeldung) anschließen.

Bis vor kurzem war die praktische Nutzbarkeit von mobilen Gruppe-I-Introns bzw. HEGs noch als problematisch einzuschätzen. Grund hierfür war der relativ schwer zu

manipulierende Erkennungsmechanismus der Ziel-DNA, welcher auf Interaktionen bestimmter Aminosäurereste der Homing-Endonuclease mit der Zielsequenz beruht. Deshalb stellte sich die Entwicklung von Enzymen, welche bestimmte neue Zielsequenzen erkennen, vergleichsweise schwierig dar. Bahnbrechende Fortschritte auf diesem Gebiet konnten diese Probleme jedoch weitgehend lösen und wurden hochrangig publiziert (Ashworth et al., 2006; Rosen et al., 2006): Durch computergestützte Proteinmodellierung konnten Ashworth und Kollegen die Erkennungssequenz von HEGs alterieren, ohne dass dadurch die Bindungsaffinität der Homing-Endonuclease beeinträchtigt wurde.

III.3 Alternatives und effizienteres Gen-Konversionskonstrukt und Verfahren zur Vererbung von Genmobilität sowie Verwendung des Konstruktes

Noch bevor sich diese Neuerungen ergaben, suchten wir nach einem anderen, einfacher zu manipulierenden egoistischen Gen als Instrument der bereits beschriebenen genetischen Eingriffe. Mobile Gruppe-II-Introns erwiesen sich als ideale Alternative zu den bereits beschriebenen Intron-Konstrukten der Gruppe I. Sie teilen mit diesen sämtliche oben genannten interessante Merkmale von ortsspezifischen egoistischen Genen, sind zusätzlich aber einfach in einer Weise zu verändern, dass sie neue, therapeutisch interessante target-Sequenzen erkennen. Hierfür ist ein anderer Erkennungsmechanismus verantwortlich.

Unsere Arbeiten führten uns deshalb zur Entwicklung eines weiteren Gen-Konversionskonstruktes (basierend auf einem Gruppe-II-Intron als wesentlicher Katalysator der Genmobilität), welches im Weiteren detailliert beschrieben werden soll. Unser Konstrukt wurde von BayernPatent begutachtet und daraufhin der Universität Würzburg zur Patentierung anempfohlen (Patentanmeldung U30010 DPMA). Einen weltweiten Patentschutz stellt die unlängst (02.05.2007) eingereichte PCT-Anmeldung sicher, Firmeninteresse ist z. B. von SIGMA Aldrich (St. Louis, USA) bekundet worden.

Hintergrund

Bevor ich an die eigentliche Beschreibung des Konstrukts gehe, sei zunächst der für das Verständnis nötige wissenschaftliche Hintergrund zusammengefasst.

Da es sich bei Gruppe-II-Introns ebenfalls um egoistische Gene handelt, entsprechen deren grundlegende Charakteristika denen von mobilen Introns der Gruppe I bzw. HEGs. Ebenso wie jene sind sie in der Lage, die Mendel'schen Vererbungsregeln durch ortsspezifische Transpositionsvorgänge zu umgehen. Die Transposition ist gleichfalls extrem effizient und erreicht Wahrscheinlichkeiten von bis zu 100%, wobei das mobile Intron wiederum in eine homologe „Heimatsequenz“ springt.

Lediglich der Transpositionsmechanismus weicht stark von dem bereits beschriebenen ab und stellt sich wesentlich komplizierter dar. Basenpaarungen zwischen RNA-Intermediaten des Introns und der Zielsequenz spielen die wesentliche Rolle bei der Erkennung der letzteren und sind verantwortlich für die einfache Manipulierbarkeit des Intron-Homings. Außerdem basiert die Mobilität auf Eigenschaften eines multifunktionalen Proteins (intron encoded protein = IEP), welches Maturase-, reverse Transkriptase-, und DNA-Endonuklease-Aktivitäten besitzt.

Nach der Translation des durch das Intron kodierten Proteins (intron encoded protein = IEP) bewirkt dieses das Spleißen der RNA, vermutlich chaperon-ähnlich, indem die Formierung der katalytisch aktiven Form der Intron-RNA erleichtert wird. Protein und Intron-RNA bilden daraufhin einen Ribonucleoprotein-Komplex (RNP). Hierauf fügt sich die Intron-RNA durch umgekehrtes (reverse) Spleißen in den sense-Strang des erkannten DNA-Abschnitts ein, worauf das IEP den antisense-Strang versetzt schneidet und, dessen 3'-Ende als Primer nutzend, die Intron-RNA-Matrize umgekehrt transkribiert. Die resultierende cDNA wird durch Reparatur- oder Rekombinationsmechanismen in die Wirts-DNA integriert (Belfort et al., 2002).

Es können neue Gruppe-II-Introns hergestellt werden, die beliebige neue target-Sequenzen erkennen und sich in diese einfügen. Dies geschieht durch Angleichen der Intron-RNA-Sequenz an die Sequenz der jeweiligen DNA-Zielsequenz. Diese Verfahren sind in der internationalen Patentanmeldung WO 02/059362 und in wissenschaftlichen Veröffentlichungen diskutiert (Guo et al., 2000; Frazier et al., 2003; Perkuta et al., 2004; Zhong et al., 2003; Karberg et al., 2001). Die weiteren Patentanmeldungen bzw. Patentschriften WO 01/29059, US2003/104352, WO 98/54353, US 6,001,608 und US 5,698,421 unterrichten über den Stand der Technik. Computergestützt können heute Gruppe-II-Introns hergestellt werden, welche sich in jeden erdenklichen Genloкус einfügen (Perkuta et al., 2004). Die Funktionalität von

Gruppe-II-Introns auf eukaryonter Ebene wurde kürzlich nachgewiesen (WO 2005/123937 A und WO 2005/123962 A).

Einerseits können die dargestellten Techniken zur Unterbrechung von Wirtsgenen genutzt werden. Ein Knockout-Kit, basierend auf diesen Grundlagen, ist bereits käuflich zu erwerben (TargeTron Gene Knockout System, Product Code TA0100, angeboten durch die Firma SIGMA-ALDRICH). Andererseits können mithilfe von modifizierten Gruppe-II-Introns fremde Gene ins Wirtsgenom eingeführt werden. Beide Möglichkeiten werden im Folgenden beschrieben.

Normalerweise unterbrechen Gruppe-II-Introns die Wirtsgene nicht funktionell, da sie sich auf RNA-Ebene selbst herausspleißen. Um dies zu verhindern, schuf man Gruppe-II-Introns, welche eine Deletion in dem offenen Leseraster (ORF) besitzen, der für das Intron-kodierte Protein kodiert. Das Intron-kodierte Protein wird getrennt vom Intron exprimiert. Somit wird eine dauerhafte Genunterbrechung auf der Grundlage eines Introns erreicht, welches die Fähigkeit des Selbst-Spleißens und damit verbunden auch die der eigenständigen Mobilität verloren hatte (Frazier et al., 2003; Perkuta et al., 2004; Zhong et al., 2003; Karberg et al., 2001). Es wurde auch versucht, die Genunterbrechung durch Expression des IEP *in trans* aufzuheben, doch waren die Ergebnisse unbefriedigend. Es wurde ein Niveau der Genexpression erreicht, welches gegenüber dem Wildtyp bei nur ca. 21% lag. Diese generelle Verminderung der Effizienz des Splicing-Vorgangs bei der Bereitstellung des Intron-kodierten Proteins *in trans* wurde auch auf die Trennung des Intron-kodierten Proteins von der eigentlichen Lage in der mRNA zurückgeführt, da hierdurch die richtige Formierung und Funktion des RNP-Komplexes beeinträchtigt werden kann (Frazier et al., 2003).

Durch Einbau in die Domäne IV des Introns konnten bereits erfolgreich neue Gene wie Kanamycin- (Matsuura et al., 1997) und Tetracyclin-Resistenzmarker sowie ein Phagenresistenzgen (*abiD*) (Frazier et al., 2003) ins Wirtsgenom eingeführt werden, ohne dass hierdurch die Homing-Aktivität des Konstruktes zerstört wurde.

Für unser Vorhaben (die genetische Veränderung ganzer Anopheles- bzw. Plasmodium-Populationen) erwies es sich als Herausforderung, dass im Unterschied zu Transposons für Gruppe-II-Introns noch kein Konstrukt entwickelt wurde, welches in Stande ist, die Möglichkeit der Genunterbrechung bzw. Genneueinführung mit der Erhaltung der Mobilität nach erstmaliger Transposition ins Wirtsgenom zu verbinden.

Das heißt, bisher ist es nicht möglich, die Fähigkeit der Mobilität und der damit verbundenen Gen-Konversion an die Tochtergeneration zu vererben. Eine Vererbung, im Sinne einer Erhaltung und Weitergabe der Funktion an die nächste Zellgeneration ist aber für jedes Populationsengineering notwendig, ohne dass hierdurch die Genunterbrechung bzw. Genkonversion aufgehoben wird.

Wie geschildert ist man bislang noch nicht in der Lage, mittels Gruppe-II-Introns eine komplett reversible, konditionale Genunterbrechung bzw. -neueinführung zu etablieren, da bisher die Effizienz des Spleißens in zu großem Maße durch Modifikationen am Gruppe-II-Intron vermindert wird. Ein unbeeinträchtigter Spleißvorgang bewirkt die Exzision der Intron-mRNA aus dem unterbrochenen Exon-mRNA-Bereich und kann somit den Gen-Knockout vollkommen rückgängig machen, solange der Spleißvorgang aktiviert ist.

Wir beabsichtigten deshalb ein modifiziertes Gruppe-II-Intron zu kreieren, welches eine stabile Vererbung der Genmobilität auf die nächste Zellgeneration erlaubt. Dieses Intron sollte also in der Lage sein, Wirtsgene zu unterbrechen bzw. fremde Gene ins Wirtsgenom einzuführen, ohne hierdurch die Fähigkeit der eigenen Mobilität zu verlieren. Außerdem sollte das Gen-Konversionskonstrukt vollkommen reversible, für beliebige Dauer bestehende Genunterbrechungen bzw. -neueinführungen erlauben.

Beschreibung des Konstrukts

Bei der wissenschaftlichen Nutzung von Gruppe-II-Introns besteht das Problem, dass die Mobilität der Konstrukte an das Spleißen der mRNA gekoppelt ist, d. h. in dem Moment, in welchem das Intron „springt“, wird die Intron-RNA gespleißt und somit die Genunterbrechung bzw. -neueinführung aufgehoben. Um dennoch eine dauerhafte Unterbrechung des Wirts-Genlokus auch bei erhaltener Transpositionsfähigkeit des Gruppe-II-Introns zu erreichen, mussten wir den Vorgang des „Homings“ auf einen klar begrenzten Zeitraum beschränken. Dies erreichten wir, indem wir die Expression des Intron-kodierten Proteins, welches die Mobilität katalysiert, von der Transkription der mRNA entkoppelten.

Der offene Leserahmen, welcher für das Intron-kodierte Protein kodiert, wurde nicht ausgeschnitten, sondern invertiert und somit in der Intron-DNA belassen. Diese Inversion bedingt, dass das offene Leseraster nicht mehr in der ursprünglichen Richtung, d. h. vom ersten Promotor (= Promotor des Exons) ausgehend, sondern

jetzt in der entgegengesetzten Richtung (auf dem Gegenstrang) vom zweiten Promotor aus gelesen werden kann. Das Intron-kodierte Protein wird je nach dem Zweck, welchen der genetische Eingriff erfüllen soll, unter die Kontrolle eines entweder für gewisse Entwicklungsstadien bzw. Zelldifferenzierungen spezifischen oder induzierbaren Promotors gestellt (u. a. unter Verwendung von „tess“ <http://www.cbil.upenn.edu/tess/> oder dem „Genomatix“-System, s. o.). Nach Bedarf wird ein Terminator der Transkription stromaufwärts des spezifischen Promotors platziert, um einen unwahrscheinlichen, aber dennoch möglichen ORF zu beenden. Der erste (= Exon-Promotor) und der zweite Promotor (neu eingeführter, spezifischer Promotor) müssen gleichzeitig aktiv sein. Der Prozess des „Homings“ und das damit verbundene Spleißen sind damit auf frei wählbare Zeiträume beschränkt, das betreffende Wirtsgen ist also für den Rest der Zeit unterbrochen und es verbleibt das etwaige neu eingeführte, fremde Gen ungespleißt in der mRNA.

Somit lösten wir auch das zweite Problem, indem bei Bereitstellung der induzierenden Substanz der Promotor aktiviert, das IEP konsekutiv translatiert, das Spleißen der Intron-RNA realisiert und damit die Genunterbrechung auf RNA-Ebene aufgehoben wird.

Ausführungsbeispiel

Ich möchte das Konstrukt anhand des wohlbekannten Gruppe-II-Introns L1.LtrB von *Lactococcus lactis* erläutern. Abb. 7 zeigt das Intron und stellt unsere Modifikationen dar. Die Herstellung und eingehende Testung des Konstruktes in *E. coli* ist am Biozentrum der Universität Würzburg möglich und wird derzeit in einer Zusammenarbeit mit der Mikrobiologie (Professor Roy Gross) und der Bioinformatik realisiert. Hierfür wurde eine molekulare Klonierungsstrategie entwickelt, welche nur kurz umrissen werden soll: Durch geschickten PCR-Einsatz wird der neuartige Gen-Konversionsvektor aus vier Einzelfragmenten (mit vier verschiedenen Restriktionsendonuclease-Schnittstellen) synthetisiert. Als Grundlage dient der von der Firma SIGMA Aldrich vertriebene *targetron*-Vektor pACD4K-C. Bezüglich der notwendigen Standard-Klonierungstechniken orientierten wir uns an einschlägig bekannten Handbüchern der Molekularbiologie (Mc Pherson, 2000; Sambrook und Russell, 2001).

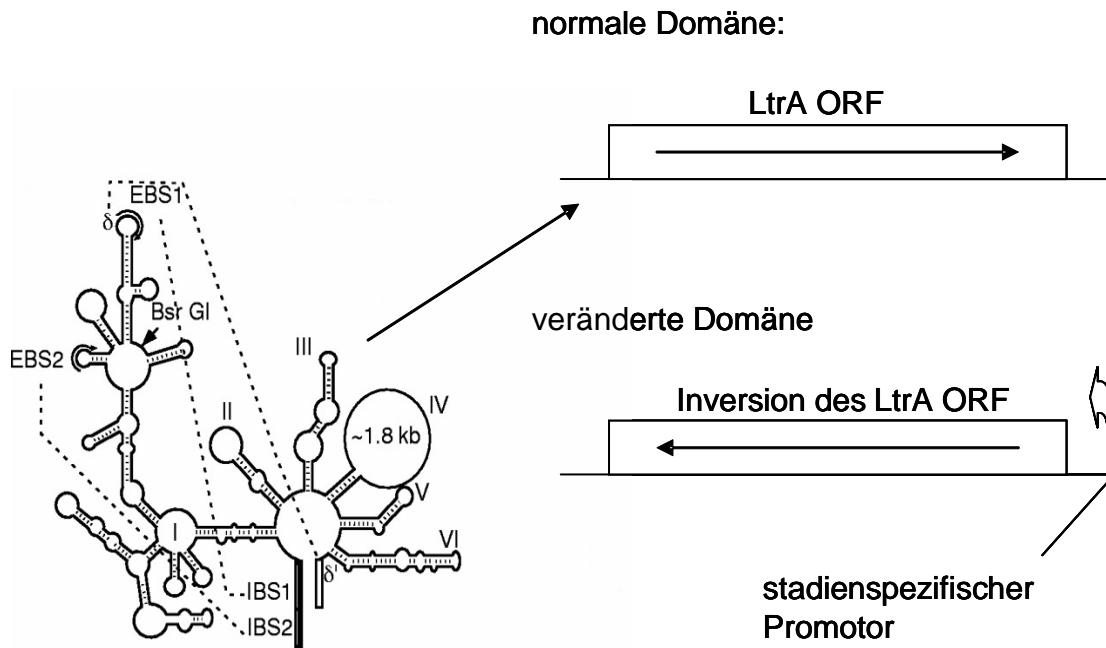
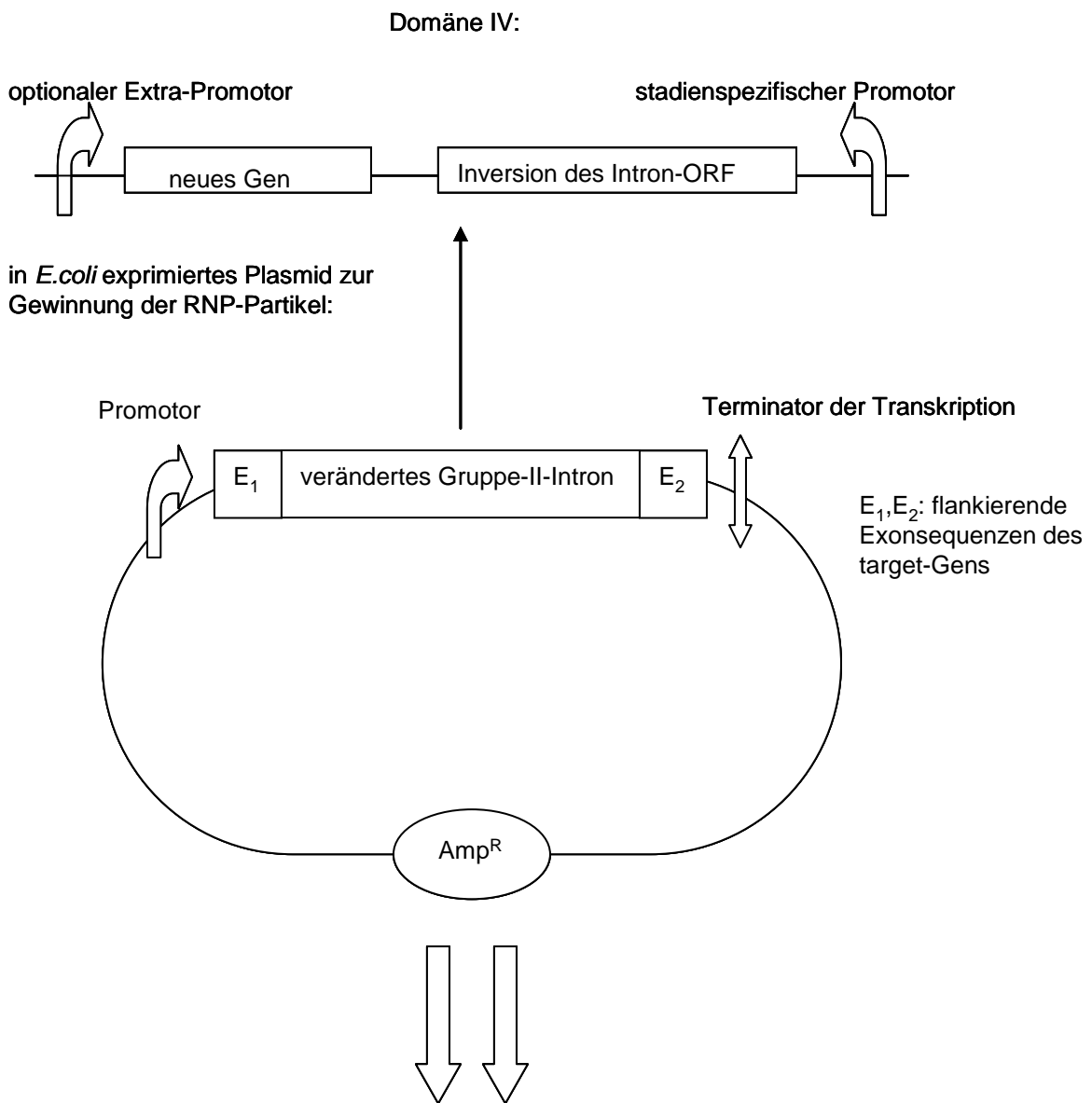


Abb. 7: Grundlegende Modifikation des Gruppe-II-Introns

Gezeigt sind auf der linken Seite die strukturelle Darstellung des L1.LtrB Introns sowie auf der rechten Seite die im Text beschriebene Inversion des offenen Leserahmens innerhalb der Domäne IV, welches für das IEP kodiert (modifiziert nach Guo et al., 2000).

Abb. 8 stellt beispielhaft die Ausführung der genetischen Manipulation einer Zielpopulation dar, wobei im Speziellen die Einführung eines neuen Gens in die Wirts-DNA realisiert wurde. Dargestellt ist wiederum ein Gruppe-II-Intron, dessen Domäne IV modifiziert wurde. Diese enthält eine Inversion des ORF des Intron-kodierten Proteins, das als LtrA ORF bezeichnet wird. Es steht unter der Kontrolle eines bereits weiter oben beschriebenen spezifischen Promotors. Das neu einzuführende Fremdgen steht optional unter der Kontrolle eines eigenen homologen Promotors, um Einfluss auf das Expressionsprofil des neuen Gens zu nehmen. Die Intronsequenzen, welche durch RNA-DNA-Basenpaarungen verantwortlich sind für die Erkennung der Ziel-DNA, sind dahingehend abgewandelt, dass die beabsichtigte Sequenz erkannt werden kann. Das Konstrukt wird in ein Plasmid integriert und in *E. coli* prozessiert. Das veränderte Intron wird gesäumt von den flankierenden Exonsequenzen E1 und E2 aus dem Zielgen. Das Plasmid verfügt außerdem über einen Resistenzmarker (z. B. für Ampicillin), welcher für die Selektion der das Plasmid tragenden Bakterien notwendig ist. Mit diesem Konstrukt können RNP-Partikel hergestellt werden, welche letztendlich, verpackt in Liposomen, durch Elektroporation in die Wirtszelle eingebracht werden, wo sie die Einführung des

fremden Gens ins Wirtsgenom bewirken. Das heißt, für diesen letzten Schritt ist kein Vektor vonnöten.



RNP-Partikel bestehend aus exzidierter Intron-RNA und IEP, welche hierauf, verpackt in Lysosomen, in die Wirtszelle eingebracht werden.

Abb. 8: Ausführungsbeispiel für den Ersatz eines Wirtsgens durch ein neu eingeführtes Gen

Die Struktur der modifizierten Domäne IV des Gruppe-II-Introns ist oberhalb des Plasmids (Derivat von pACD4K-C), welches das gesamte Konstrukt enthält, detailliert dargestellt. Die Domäne enthält eine Inversion des Intron-ORFs (1800 Basenpaare) unter der Kontrolle eines stadienspezifischen Promotors und das einzuführende neue Gen (dessen Transkription je nach Bedarf auch durch einen zusätzlichen Promotor kontrolliert werden kann). Beide Komponenten sind nach der Position 3711 in den Originalvektor (pACD4K-C) eingefügt.

Das Plasmid selbst enthält das von Exonsequenzen des Zielgens flankierte modifizierte Intron, dessen Transkription durch einen konstitutiven Promotor (spc ribosomal protein operon promoter) gesteuert wird, einen Terminator der Transkription (*E. coli* rrnB T1) und ein Ampicillin-Resistenzgen.

Der Fachmann kann je nach genutztem Zelltyp das Konstrukt und den Vektor mit Standardtechniken herstellen oder modifizieren, etwa mit zusätzlicher Lokalisationssequenz, verbesserter Expression oder verbessertem Codongebrauch.

Erzielbare Vorteile und Erläuterungen zur Ausgestaltung unseres Konstruktes

Wie eingangs dargestellt, sind die Gen-Konversionskonstrukte für das population genetic engineering von außerordentlichem Wert, da sich herausstellte, dass sich mutante Genotypen in der Natur durch einfache Mendel'sche Vererbung ihrer genetischen Varianten kaum durchsetzen können.

Es gibt grundsätzlich drei Modifikationstypen, welche die Konstrukte ermöglichen:

1a. Unterbrechung eines Gens

1b. Unterbrechung eines Gens und Ausrottung bzw. Größenkontrolle einer Population, falls der Knockout rezessiv und essentiell ist:

Das Gen-Konversionskonstrukt unterbricht ein essentielles rezessives Gen. Der Promotor wird meiose- bzw. keimbahnspezifisch gewählt. Wie bereits erörtert, führt die Rezessivität des Knockouts zu dessen Ausbreitung in der Population, obwohl das ausgeschaltete Gen essentiell ist, da nur homozygote Knockouts lebensunfähig sind. Durch den Einsatz des erwähnten Promotors steigt zunächst nur die Frequenz der heterozygoten Knockout-Träger an, die lebensfähig sind. Später erhöht sich zunehmend die Frequenz der homozygoten Knockouts, was schließlich im Extremfall zur Ausrottung führt.

Eine modifizierte Form dieser Strategie für Plasmodien (vornehmlich haploid) wird weiter unten erläutert.

2a. Einführung eines neuen Gens durch sein Einfügen in die Domäne IV des modifizierten Gruppe-II-Introns

Das Konstrukt muss sich hierfür in einen nicht-kodierenden Bereich des Genoms hineinkopieren (z. B. egoistische DNA (LINES, SINES etc.), Promotoren, repetitive Bereiche, CpY Inseln, Mikrosatelliten oder strukturelle DNA).

2b. Effizientere indirekte Einführung eines neuen Gens

Das Gen-Konversionskonstrukt unterbricht ein essenzielles Gen und rottet im Extremfall die Wildtyp-Population aus. Synchron wird die bevorzugte Mutante durch Koppelung des neuen Gens an eine Variante des essentiellen Gens, welche durch das Intron nicht erkannt wird, eingeführt. Diese Variante besteht im einfachsten Fall aus einer Inversion, wobei auch durch Ausnutzung der Degeneration des genetischen Codes weitere Varianten erzeugt werden können. Der Knockout muss hierbei rezessiv und der Promotor rein meiose- bzw. keimbahnspezifisch gewählt werden.

3a. Ersatz eines Gens durch ein anderes

Das zu ersetzende Gen wird vom modifizierten Gruppe-II-Intron anvisiert und das neue Gen in dessen Domäne IV eingefügt.

3b. Ersatz eines Gens durch ein anderes (Variante)

Das zu ersetzende Gen wird durch ein modifiziertes Gruppe-II-Intron unterbrochen. Das neue Gen wird gleichzeitig eingeführt.

Um eine möglichst effiziente Ausbreitung eines neuen Genotyps zu erreichen, sollte ein Promotor gewählt werden (Nutzung geeigneter Software hierzu wie oben beschrieben), welcher in folgenden Entwicklungsstadien bzw. Zellarten aktiv ist:

- Diploide Taxa: erste Entwicklungsstadien der Zygote (z. B. Promotoren von Oct-Genen); die Genkonversion nach der Befruchtung der Eizelle führt zu homozygoten Individuen
- Vornehmlich haploide Organismen, zum Beispiel Plasmodien: postmeiotische Synzytialphase oder diploides Entwicklungsstadium

Aufgrund dieser Wahl befänden sich sofort ausschließlich homozygote Merkmalsträger unter den Nachkommen der modifizierten diploiden Organismen bzw. wären alle Nachkommen der veränderten Plasmodien Merkmalsträger bezüglich der Veränderung.

Dies gilt aber nicht für die Spezialfälle 1b und 2b, da hierbei die sofortige Homozygotie vermieden werden muss.

Kalkulationen zur Ausbreitung der Konstrukte

Die Frequenz der homozygoten bzw. hemizygoten Merkmalsträger in der Moskito- bzw. Plasmodienpopulation lässt sich für die Modifikationstypen 1a, 2a und 3

näherungsweise mit der folgenden Formel abschätzen (der Formalismus gilt selbstverständlich auch für das andere Gen-Konversionskonstrukt):

$$x_n = x_0 ([1+T]F)^n$$

x_n : Frequenz in der n-ten Generation

x_0 : Einführungsfrequenz

T: transmission distortion ratio = Homing-Frequenz des egoistischen Gens

F: Fitness im Vergleich zum wt

Betrüge die Aussetzungsfrequenz beispielsweise 0,1%, die transmission distortion ratio 0,9 und bedingte das Konstrukt keinen Fitnessnachteil, so wäre nach bereits 11 Generationen eine Frequenz von 90% erreicht. Selbst ein überaus pessimistisches Szenario ($x=0,0001$, $F=0,8$ und $T=0,66$) lieferte diesen Wert nach 35 Generationen. Auf die mathematischen Simulationen der indirekten Einführung eines neuen Gens und der Eradikationsstrategie verzichten wir an dieser Stelle, da diese bereits von A. Burt (2003) publiziert wurden.

Weitere Anwendungsgebiete

Zunächst seien wichtige, medizinisch relevante Applikationsbereiche angeführt:

1. HIV-Therapie

Bereits Guo und Kollegen (Guo et al., 2000) zeigten anhand von Transpositionsexperimenten, dass Gruppe-II-Introns zukünftig in der HIV-Therapie genutzt werden könnten. Man erreichte sowohl die Unterbrechung des Genoms des Provirus als auch die Ausschaltung des CCR Chemokin-Rezeptors, was die Resistenz des betroffenen T-Lymphozyten gegenüber HIV bedingt, jedoch nicht mit einer Schädigung oder Funktionsbeeinträchtigung der Zelle einhergeht.

Das Gen-Konversionskonstrukt würde entweder in einem geeigneten Vektor (z. B. Adenoviren), welcher die Wirtszellen des HI-Virus befällt, in den menschlichen Körper eingebracht oder mittels Elektroporation dazu genutzt, Patienten-Lymphozyten *in vivo* resistent zu machen. Die resistenten Zellen würden sich daraufhin im menschlichen Körper ungehindert vermehren.

2. Krebstherapie

Die Gen-Konversionskonstrukte sind außerdem für die Gentherapie geeignet. Die Einführung von Tumorsuppressorgenen (z. B. p53) sowie die Ausschaltung von Onkogenen (z. B. k-ras) wirken der Pathogenese verschiedenster Tumorleiden entgegen. Es können Gruppe-II-Introns verwendet werden, welche entweder in ihrer Domäne IV bestimmte Tumorsuppressorgene tragen (die ihrerseits durch die Wahl eines geeigneten Promotors mehr oder weniger stark exprimiert werden) und nicht-kodierende Bereiche des menschlichen Genoms erkennen (s. Seite 37) oder sich in Onkogene inserieren, die bei einem Patientenkollektiv überexprimiert sind und somit die assoziierten pathophysiologischen Konsequenzen rückgängig machen. Das veränderte Gruppe-II-Intron kann mittels eines geeigneten Vektors (Adenoviren etc.) in die entartete Zellpopulation eingebracht werden.

Die Auswahl der in Frage kommenden Gene muss selbstverständlich an die pathogenetischen Ursachen des jeweiligen Tumorleidens angepasst werden. Der große Vorteil dieser Behandlungsmethode gegenüber konservativen Behandlungen (Bestrahlung, Chemotherapie) ist das Fehlen einschlägiger Nebenwirkungen dieser konservativen Therapieformen für den behandelten Patienten. Aus diesem Grunde kann das Verfahren auch in Kombination mit konservativen Therapiemöglichkeiten angewendet werden, da hierdurch die oft gravierenden Nebenwirkungen verringert werden. Eine geringere Dosis des konservativen Behandlungsschemas sollte in diesem Fall keine Einbuße des Therapieerfolgs bedingen. Dies könnte eine deutliche Verbesserung bei der Behandlung von bisher schlecht zu therapierenden Tumoren (z. B. Gliome, primäre hepatozelluläre Karzinome, Pankreaskarzinome) bzw. Krankheitsstadien bedingen.

Bestimmte virusassoziierte Tumoren sind der Therapie durch Gruppe-II- oder I-Introns in besonderer Weise zugänglich. Hierzu zählen u. a.: T-Zell-Leukämie (HTLV1 und 2); zervikale intraepitheliale Neoplasie, bowenoide Papulose, Larynxpapillom, Riesencondylom, Condyloma planum, Condyloma acuminatum, Epidermolysis verruciformis und eine große Zahl gutartiger Wucherungen (HPV); Burkitt-Lymphom, Nasopharynxkarzinom (EBV, Zugang: NC_001345); Kaposi-Sarkom (HHV8, Zugang: NC_003409 und HIV, Zugang: NC_001802). Der geeignete Therapieansatz ist hierbei wiederum die Unterbrechung des viralen bzw. proviralen Genoms an geeigneter Stelle (z. B. bei HPV im Bereich von E6, E7 [z. B. gi:

21464523, gi: 66933401 etc.] bzw. bei anderen Viren im Bereich einer DNA-Polymerase [z. B. bei EBV gi: 28566757]). Es werden zur Einführung der Gen-Konversionskonstrukte vorzugsweise die Viren als Vektoren verwendet, die bekämpft werden sollen. Dies hätte den eklatanten Vorteil, dass man die targets, in diesem Falle Viren, überall aufspüren könnte, da ja die Wirtszellen logischerweise identisch sind. Hierzu müssen die Viruspartikel zunächst vollkommen oder teilweise frei von Erbsubstanz sein. Auf diese Weise kann beispielsweise HPV mit HPV behandelt werden. Dasselbe gilt auch für HIV und andere extrem virulente Viren, wobei weitere Sicherheitsmaßnahmen notwendig sind. U. a. denkbar ist die Verwendung von reinem Hüllprotein und Adhäsionsrezeptor ohne Virus-RNA. Die Diagnose muss in jedem Fall vollständig geklärt sein. Das Risiko von gefährlichen Rekombinationen kann durch geeignete Deletionen minimiert werden.

Außerdem stellt sich die Therapie der meisten Fälle (90%) von chronisch myeloischer Leukämie erstaunlich einfach dar. Die Unterbrechung des Philadelphia-Translokationschromosoms im Bereich des für die Tyrosinkinase kodierenden Lokus wird die heutigen Behandlungsmöglichkeiten in ihrer Wirksamkeit übertreffen. Der OMIM disease identifier, mit welchem die möglichen target-Sequenzen ausfindig gemacht werden können, ist *151410.

3. Nutzungsmöglichkeiten in Bezug auf Erbkrankheiten

Die Gen-Konversionskonstrukte können ebenfalls für die Therapie von Erbleiden, insbesondere von monogen bedingten Erbleiden genutzt werden. Beispielhaft seien Mukoviszidose, monogene Hypercholesterinämie, Marfan-Syndrom, Hämophilie A und Progressive Muskeldystrophie genannt.

Trinukleotid-Erkrankungen, wie z. B. Chorea Huntington oder Friedreich-Ataxie können beispielsweise durch den Einsatz eines Gruppe-II-Introns, welches den pathologischen Gen-Ort unterbricht und gleichzeitig das „gesunde“ Gen mit sich führt, therapiert werden. Als Folge werden sich keine pathologischen Proteine - Huntingtin und Frataxin - mehr ansammeln, sondern das physiologische Genprodukt wird gebildet. Die OMIM disease identifier für die „gesunden“ Gene wären hierbei +143100 bzw. *606829.

Auch die unterschiedlichsten Stoffwechseldefekte sind mit den oben erläuterten Methoden zu therapieren. Als Beispiel sei die Phenylketonurie erwähnt: Die effiziente Einführung des intakten Gens (gi: 18765884), welches für das bei der Erkrankung

defekte Enzym kodiert (Phenylalaninhydroxylase), steht für die erfolgreiche Therapie der Erkrankung. Ebenso kann Albinismus durch die Einführung des intakten Tyrosinase-Gens (Genbank Identifier gi: 12656242) behandelt werden. Mukoviszidose kann mit dem Ersatz des defekten Chlorid-Kanals durch das intakte Protein (OMIM disease identifier: *602421) therapiert werden.

Darüber hinaus gibt es eine Reihe nichtmedizinischer Nutzungsmöglichkeiten. Durch den Einsatz der Konstrukte können Gene gezielt an- und ausgeschaltet werden, indem ein induzierbarer Promotor für die Transkription des Intron-kodierten Proteins verwendet wird. Ein Wirtsgen wird durch die Integration des Gen-Konstruktes ausgeschaltet und durch dessen Spleißen nach Induktion des Promotors auf mRNA-Ebene wieder angeschaltet. Gleiches gilt für ein neu eingeführtes Gen, nur mit dem Unterschied, dass dieses durch den Spleißvorgang exzidiert und somit ausgeschaltet wird. Ein solcher On/Off-Mechanismus wird derzeit nur durch das Tet-System erreicht. Der große Vorteil des neuartigen Konstruktes ist jedoch die Tatsache, dass es in genetisch unveränderten Wildtyp-Organismen oder -Zellen verwendet werden kann. Die Herstellung bestimmter Stoffe (z. B. Humaninsulin oder Erythropoetin) könnte somit auf klar bestimmte Zeiträume festgelegt werden.

Um zu Versuchszwecken bei bestimmten Organismen einen Knockout zu etablieren, greift man heutzutage auf das Cre- bzw. Lox-Rekombinase-System zurück. Hierbei muss jedoch das auszuschaltende Gen zunächst mit flankierenden Rekombinase-Sequenzen versehen werden. Das vorgestellte System kommt ohne jegliche vorhergehende Modifikation des Wirtsorganismus aus und ermöglicht außerdem die Einführung neuer Gene.

Schließlich können die Gen-Konversionskonstrukte in der Schädlingsbekämpfung Verwendung finden. Eine solche Schädlingsbekämpfung betrifft auch die genetische Modifikation bzw. Ausrottung von Spezies, die durch den Menschen in Lebensräume eingeführt wurde, die nicht die natürlichen Lebensräume darstellen. Ein Beispiel ist die *Gefleckte Flockenblume* in den USA.

Wohlweislich darf der Fachmann solche Konstrukte nicht unethisch einsetzen. Das Artgleichgewicht darf nicht gestört und negative Folgen ökologischer Lücken müssen auch bei der Dezimierung von Schädlingen vermieden werden. Selbstverständlich dürfen ähnliche Konstrukte niemals in die menschliche Keimbahn gelangen, was

aber sowohl durch die spezifische Herstellung als auch durch die spezifische Nutzung jeweils ausgeschlossen werden kann (s. o.).

Schließlich können die Gen-Konversionskonstrukte als Forschungswerkzeuge, insbesondere als molekularbiologische Forschungswerkzeuge zur Herstellung genetisch veränderter Zellen sowie genetisch veränderter Bakterien, Viren, Protozoen, Pilze, Pflanzen und Tiere genutzt werden.

III.4 Nutzung der vorgestellten Konstrukte zur Bekämpfung der Malaria

Die vorgestellten Gen-Konversionskonstrukte können für die genetische Manipulation ausgewählter Zielpopulationen eingesetzt werden. Diese Strategien können besonders in Entwicklungsländern zur Bekämpfung bestimmter Infektionskrankheiten genutzt werden. Die vorliegende Arbeit hat die Darstellung eines effizienten Ansatzes zur Eindämmung der Malaria zum Ziel. Wir entwickelten die beschriebenen Technologien ursprünglich auch lediglich zu diesem Zweck.

Am Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg wird seit 1999 im Bereich der Malariaforschung gearbeitet. Das Projekt B2 im Sonderforschungsbereich 544 ist ein Forschungsschwerpunkt zum Thema Malaria. Seit längerem wird an einigen neuartigen pharmakologischen Ansätzen geforscht. So wurden in einem Kombinationspräparat (BlueCQ) die antiparasitären Wirkungen von Methylenblau und Chloroquin getestet. Derzeit wird die Wirksamkeit des Präparates in einer Phase-II-Studie in Burkina Faso evaluiert. Es zeigte sich jedoch, dass die Kombination dieser beiden Stoffe nicht wirksamer ist als Methylenblau allein: Klinische bzw. mikrobiologische Versagerraten lagen bei 10% bzw. 24% (Meissner et al., 2005 und 2006). Da weder für die humanen Malariaformen Resistenzen gegen Methylenblau bekannt sind, noch im Tiermodell solche erzeugt werden konnten, wird weiterhin nach einem potenten Kombinationspartner gesucht. 2005 konnten im SFB 544 für eine Kombination mit Artemisininderivaten (BlueArte; *in-vitro*-Testung) synergistische Effekte nachgewiesen werden (Akoachere et al., 2005). Die günstige Resistenzsituation lässt deshalb BlueArte als eine vielversprechende Behandlungsoption für medikamentenresistente Malaria erscheinen.

Im Folgenden sollen die Möglichkeiten und Auswirkungen der genetischen Veränderung sowohl der Vektoren (v. a. *A. gambiae*) als auch der Plasmodien (v. a. *P. falciparum*) selbst mittels ortsspezifischen egoistischen Genen theoretisch und bioinformatisch analysiert und diskutiert werden.

III.4.1 Anopheles-targets

Der erste Gedanke, welcher in diesem Zusammenhang aufkommt, ist die Ausrottung des missliebigen Überträgers. Ethische und ökologische Bedenken lassen diese Vorgehensweise jedoch fragwürdig erscheinen.

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens resistenter Mutanten bei einem Ausrottungsversuch, welche das Vorhaben vereiteln könnten, wurde bereits diskutiert.

Zudem beschränkt sich die Übertragung nicht nur auf eine Art und selbst bei Auslöschung der derzeit wichtigsten Malaria-Vektoren bliebe zu bedenken, dass sich wahrscheinlich ein neuer Platzhalter für die Besetzung der freigewordenen Nische finden würde.

Vergegenwärtigt man sich außerdem die Tatsache, dass eine Steigerung der Regenwaldabholzung um 1% regional einen Anstieg der Anophelespopulationen um 8% bedingt (Pearson, 2003), könnte man wohl zu der Einsicht gelangen, es wären zunächst ökologische Wege zu beschreiten, um der Mückenexpansion entgegenzuwirken.

Bereits im Jahr 1992 wurde die Möglichkeit diskutiert, Vektorpopulationen über die Einführung von Resistenzgenen mittels transponibler Elemente Parasiten gegenüber immun zu machen (Kidwell und Ribeiro, 1992); ein Gedanke, welcher, besonders auf die Malaria-Moskitos übertragen, sehr einleuchtend erscheint, wenn man bedenkt, dass jede Infektion für diese stets mit einer Schädigung einhergeht (verminderte Lebenszeit, Fruchtbarkeit und Flugstrecke), resistente Individuen also den sensiblen gegenüber zunächst einen relativen Fitnessvorteil besitzen. Wahrscheinlich aufgrund der Tatsache, dass erwähnte transponible Elemente dem Wirtsorganismus jedoch zu großen Schaden zufügen würden, als dass sie sich in der Tat ausbreiten könnten, wurde der Gedanke nicht umgesetzt.

Die nahezu unfehlbare Spezifität der Sequenzerkennung unserer Konstrukte markiert deren eklatanten Vorteil vor der letzterwähnten Strategie: dass nämlich bei diesem Vorgehen der Wirt nicht durch den drive-Mechanismus geschädigt würde, indem lediglich nicht-kodierende Sequenzen (z. B. egoistische DNA, Promotoren, repetitive Bereiche, CpY islands oder strukturelle DNA) als Insertionsstellen genutzt würden.

Da durch unsere Konstrukte ein effizienter und unschädlicher drive-Mechanismus aufgezeigt wurde, sollen im Weiteren mögliche genetische targets (siehe Tabelle 1)

und damit verbundene Genmanipulationsstrategien diskutiert werden, welche eine Resistenz der Moskitos gegenüber den Parasiten zum Ziel haben.

Tabelle 1

Vektor-targets

I. SM1-Peptid

- GE: - SM1-Peptid (Proteinsequenz: PCQRAIFQSICN)
 KO: - SM1-Rezeptor
 - agSGS 4: GenBank AY753541 (gi: 54066727)
 - agSGS 5: GenBank AY753542 (gi: 54066768)

II. Plasmodien-Resistenz

- GE: - Phospholipase A2 aus dem Gift der Honigbiene (gi: 5626)
 - PPO9 (gi: 20803452)
 - LRIM1
 - TEP1 (gi: 58386914)
 - CEC1 (gi: 58381404)
 - APL1
 - APOD
 - FBN8, 9 und 39
 - SPCLIP1
 - IRSP1
 - LRRD7
 - AgMDL1
 KO: - CTL4 (gi: 58387131)
 - CTLMA2 (gi: 583871291)
 - SRPN2 (gi: 116874263)
- } aus *Anopheles*

III. Transposon-Replikation in sensiblen Stämmen (Schädigung des Vektors, falls er nicht malariaresistent ist; siehe Text)

Plasmodium-targets

I. Eradikation

- KO: - Protein des synaptonemalen Komplexes (Burt, 2003)
 - Meiotisches dmc1-ähnliches Rekombinationsprotein:
 MAL8P1.76 (gi:124512445)
 - Vermeintliches homologes Protein zum RNA-bindenden Protein mei2:
 MAL6P1.195 (gi: 86171460)

II. GPI-Endotoxin und PRBC Sequestration

- GE: - Alkylglyceron-phosphat-synthase (AGPS), E.C.: 2.5.1.26
 (gi: 88999596)
 - 1-Acylglycerol-3-phosphat-O-acyltransferase (AGPAT),
 E.C.: 2.3.1.51, z.B. AGPAT1 (gi: 60552551)
 - PGAP1 (gi: 62865856)
 - Bst1p (gi: 850519; locus_tag: „YFL025C“; GenBank-Zugang: NC 001138)
 KO: - PfEMP-1 (z.B. gi: 124803376)

GE: Geneinführung

KO: Gen knockout

gi: GenBank gene identifier

SM1-Peptid und dessen Rezeptor

Neuere Studien ergaben, dass Ookineten die Permeierung der Darmbarriere und des Epithels der Speicheldrüsen der Moskitos rezeptorvermittelt bewerkstelligen. Man fand auch ein Peptid (SM1 – salivary gland- and midgut-binding peptide 1), welches diesen Rezeptor selektiv hemmt, und schuf eine Mückenmutante, welche durch Kombination eines SM1-Tetramer-Gens mit einem Carboxypeptidase-Promotor SM1 nur nach Blutmahlzeiten exprimiert. Obgleich die verfütterten Blutmengen hohe Gametozytenkonzentrationen (*P. berghei*) enthielten, resultierten nahezu nicht-infektiöse Moskitos (*A. stephensi*) (Ito et al., 2002). Bei Ernährung mit nicht-infektiösem Blut erwies sich die Fitness der transgenen Individuen, verglichen mit wt-Moskitos, als unbeeinträchtigt (Moreira et al., 2004). In Käfigexperimenten und darauf basierenden Modellrechnungen konnte kürzlich gezeigt werden, dass die transgenen Moskitos sogar einen fünfzig-prozentigen Fitnessvorteil gegenüber wt-Moskitos aufweisen, sobald man sie mit parasitämischem Blut ernährt (Marrelli et al., 2007). Die größere Fruchtbarkeit und reduzierte Mortalität, welche bei den transgenen Stämmen beobachtet wurde, konnte hierbei eindeutig auf die Verhinderung von infektionsassoziierten negativen Effekten zurückgeführt werden.

a) Durch die Einführung des obigen Konstruktes mittels eines egoistischen Gens kann dessen Ausbreitung bei weitem verbessert bzw. erst ermöglicht werden.

b) Noch einfacher wäre es, einen Knockout des genannten Rezeptors zu applizieren. Zunächst müsste dessen Sequenz aufgeklärt werden, da diese bis heute nicht bekannt ist. Durch Expressions-Klonierung der einzelnen, in ihrer Funktion noch unbekanntem Plasmodien-Gene wäre dies durchaus möglich. Bei besagtem Knockout ist jedoch mit gravierenden Vitalitätsverlusten zu rechnen, da wir uns nicht über die endogenen Funktionen des Rezeptors im Klaren sind. Diesem Problem ist jedoch mit der Einführung eines modifizierten Rezeptorallels zu begegnen, dessen wirtsspezifische Funktionen bei Affinitätsverlust für Ookineten möglichst unbeeinträchtigt bleiben müssten. Die einfachste Möglichkeit, diese Strategie zu realisieren, wäre der Ersatz des alten Allels durch das modifizierte.

Phospholipase A2

Gleichsam resistente Stechmücken wurden auch durch die Einführung eines Phospholipase A2 Gens erzeugt. PLA2-transgene Moskitos zeigten jedoch eine Fitnessreduktion (Moreira et al., 2004). Durch die Geneinführung mit Hilfe eines

egoistischen Gens könnte dieser Fitnessverlust, wie oben geschildert, mehr als kompensiert werden, wodurch eine Fixierung des resistenten Genotyps erreicht würde.

Infektionsabwehr-Gene

Bereits 1986 wurden malariaresistente Moskitos erforscht, welche den Erreger nach seiner Penetration der Darmwand durch eine besonders effiziente Melanisierungsreaktion einkapseln (Collins et al., 1986). Heute ist bekannt, dass das Enzym Prophenoloxidase, von dem bisher 9 Isoenzyme beschrieben wurden, maßgeblich an diesem Vorgang beteiligt ist (Christophides et al., 2002).

Von überragender Bedeutung für die Infektionsabwehr scheint darüber hinaus das 2004 entdeckte Leucin-Reiche Wiederholungen enthaltende Protein LRIM1 zu sein: Es bewirkt die Elimination der Ookineten durch Lyse und vermutlich auch durch Melanisierung (Osta et al., 2004).

Eine ähnliche Funktion hat TEP1 aus der Familie der ThioEster-enthaltenden Proteine (TEP) (Blandin und Levashina, 2004; Blandin et al., 2004).

Auch die transgene Expression von CEC1 (Cecropin) reduzierte bei Laborversuchen die Zahl von *P.-berghei*-Oozysten in infizierten Mücken (Kim et al., 2004).

Anzustreben ist wiederum die effiziente Einführung neuer Allele dieser Gene. Die Super-Mendel'sche Transmission, welche die Gene durch unsere Konstrukte aufweisen, würde dem neuen Genotyp zur Dominanz verhelfen.

Außerdem wurden kürzlich zwei hocheffiziente Antagonisten des oben genannten Melanisierungsprozesses entdeckt, deren Gen-Knockout – welcher im Rahmen einer genetischen Intervention populationsweit etabliert würde - einen Anstieg der normalen Melanisierungsrate von 0,1% beim Wildtyp auf bis zu 96,5% steigerte. Es handelt sich hierbei um zwei C-type Lectine: CTL4 und CTLMA2 (Osta et al., 2004). Ein weiterer negativer Regulator der Melanisierungskaskade ist das Serpin SRPN2 (Michel und Kafatos, 2005).

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang auch, dass alle genannten Stoffe (aus der Familie der Prophenoloxidasen PPO2, PPO3 und PPO9) nur nach der Blutmahlzeit induziert werden (Christophides et al., 2002; Osta et al., 2004, Michel und Kafatos, 2005). Vermutlich ist deshalb ein zusätzlicher negativer Fitnessseffekt durch den Energieverbrauch für die Expression dieser Gene sehr gering.

Die folgenden Gene antagonisieren ebenfalls effizient den Entwicklungszyklus der Plasmodien innerhalb ihres Moskitowirts. Hierbei ist die Wirksamkeit auch explizit für *P. falciparum* erwiesen: APL1 (Riehle et al., 2006), APOD, FBN8, FBN9, SPCLIP1, IRSP1, LRRD7, AgMDL1 und FBN39 (Dong et al., 2006). AgMDL1 und FBN39 sind durch spezifische Aktivität gegen *P. falciparum* charakterisiert. Die Expression der genannten Proteine ist verbunden mit einer deutlichen bzw. vollständigen Elimination von Oozysten im Mitteldarm der Moskitos. In Tabelle 2 findet sich eine kurze Charakterisierung der jeweiligen Proteine.

Tabelle 2: Proteinexpression im Mitteldarm des Moskitos

Genname	Ensemble <i>A. gambiae</i> Genom Datenbank Zugangscode	Proteinfamilie	Vermutete funktionelle Klasse
APL1	ENSANGG00000012041	Leucin-reiche Wiederholungen (LRW) enthaltende Proteine	genaue Funktion noch unklar; LRW enthaltende Proteine übernehmen wichtige Funktionen innerhalb des angeborenen Immunsystems: u. a. Erreger-Erkennungsfaktoren und Toll- ähnliche Rezeptoren
AgMDL1	ENSANGT00000020083	MD2-ähnliche Proteine	Muster-(pattern-)Erkennungsfaktoren
TEP1	ENSANGT00000016857	Thioester enthaltende Proteine	Muster-(pattern-)Erkennungsfaktoren
FBN8	ENSANGT00000011252	Fibrinogendomänen- Immunolektinfamilie	Muster-(pattern-)Erkennungsfaktoren
FBN9	ENSANGT00000011248	Fibrinogendomänen- Immunolektinfamilie	Muster-(pattern-)Erkennungsfaktoren
FBN39	unklar	Fibrinogendomänen- Immunolektinfamilie	Muster-(pattern-)Erkennungsfaktoren
LRRD7	ENSANGT00000021822	Leucin-reiche Wiederholungen (LRW) enthaltende Proteine	Muster-(pattern-)Erkennungsfaktoren
SP CLIP1	ENSANGT00000020158	CLIP Serinproteasen	Serinproteasen-Kaskade
IRSP1	ENSANGT00000021028	Kurze Infektionsantwort- Peptide	Proteine, welche antimikrobielle Aktivitäten vermitteln
APOD	ENSANGT00000028106	Apolipoproteine	Proteine mit verschiedenen Funktionen

III.4.2 Alternativansatz für die Fixierung natürlicher Resistenzgene

Es sollen zwei neuartige Strategien analysiert werden, um natürlicherweise vorhandenen Resistenzmechanismen (Chrisophides et al., 2002; Osta et al., 2004; Michel und Kafatos, 2005) zur Dominanz zu verhelfen.

Variante 1

Mitte 2004 wurde eine weitere recht aussichtsreiche Idee, den Malariavektor resistent zu machen, veröffentlicht (Hahn und Nuzhdin, 2004). Wie erwähnt gibt es eine Reihe natürlicher Immunitätsgene, welche durchaus wirksame Resistenz bezüglich des Parasiten vermitteln (Niare et al., 2002; Menge et al., 2006; Riehle et al., 2006). Leider verhindert der mit diesen vergesellschaftete Fitnessverlust eine Ausbreitung der Gene in einer Population. Das Bestreben geht nun dahin, den Malaria-sensiblen Mücken einen Selektionsnachteil zu verschaffen, welcher die Fitnessminderung der resistenten Konkurrenten überwiegen soll. Es konnte in den letzten beiden Jahren gezeigt werden, dass die Transkriptions-Repertoires von malariaempfindlichen und -resistenten bzw. infizierten und nicht-infizierten Mücken einige Unterschiede aufweisen, d. h. es gibt Gene, welche nur bei infizierten bzw. empfänglichen Individuen transkribiert werden. Außerdem fand man kürzlich eine unerwartete Vielfalt von transponiblen Elementen (Non-LTR-Retrotransposons) im Genom von *A. gambiae*. Die Kombination beider Befunde ergab folgendes Konstrukt:

Man möchte besagte Retroposons unter die Kontrolle eines empfänglichkeits- bzw. infektionsspezifischen Promotors bringen, welcher auch in der Keimbahn aktiv ist. Die daraus resultierende spezifische Vermehrung der Kopien des Konstrukts nur im hierfür sensiblen Genom des Wirtes kann seiner Fitness selbstverständlich niemals zuträglich sein. Modellrechnungen (Hahn und Nuzhdin, 2004) ergaben, dass auf diesem Wege eine Fixierung der Resistenzallele innerhalb von 60 Generationen (ca. vier Jahre) erreicht werden könnte. Die Voraussetzung für die Verbreitung der transponiblen Elemente ist jedoch, dass die Transpositionsrate den hierdurch erzeugten Fitnessverlust überwiegt. Dies ist zugleich die Schwachstelle wie auch unser Ansatzpunkt einer möglichen Verbesserung der Strategie: Durch Koppelung des Konstrukts an ein egoistisches Gen (welches einen nicht-kodierenden Bereich des Genoms schneidet), würden auch resistente Mücken, deren Frequenz im Laufe der Intervention aufgrund des relativen Fitnessgewinns stetig zunehmen würde, deutlich zur Verbreitung der transponiblen Elemente beitragen, indem jedes Tochterindividuum homozygot für das Konstrukt wäre, auch wenn das „Retroposon“ nicht transkribiert wird.

Variante 2

Eine alternative, einfachere und wahrscheinlich wirksamere Eingriffsmöglichkeit wäre die Folgende: Der relativ schwache Selektionsnachteil könnte durch einen absoluten, d. h. tödlichen ersetzt werden. Infrage kämen z. B. ein Gruppe-II-Intron, welches ein essentielles Gen schneidet, oder andere letale Gene (z. B. Toxine). Beide Varianten stünden unter der Kontrolle eines der erwähnten spezifischen Promotoren und würden jeweils durch ein egoistisches Gen eingeführt. Der Promotor sollte infektionsspezifisch aktiviert werden, da ansonsten nur resistente Mücken zur Verbreitung beitragen würden – die sensiblen wären anderenfalls durch einen konstitutiven letalen Knockout oder Toxinwirkungen nicht lebensfähig. Mit induzierbarem Promotor verlief jede Plasmodieninfektion der Moskitos tödlich. Dieser Ansatz birgt einen starken Schutzmechanismus vor aufkommenden escape-Mutanten:

Bis zum Zeitpunkt der Infektion und dem dadurch vermittelten Tod des Organismus bringt diese Modifikation keinen Selektionsnachteil mit sich, d. h. die die Modifikation betreffenden escape-Mutanten (target-Gene, die von den egoistischen Genen nicht erkannt werden etc.) würden in ihrer Ausbreitung nicht begünstigt, was durch Einführung eines relativen Selektionsnachteils sehr wohl der Fall wäre. Da die Infektionsraten mit Plasmodien relativ niedrig sind, wäre der Selektionsnachteil, ein funktionierendes Konstrukt zu tragen, zu vernachlässigen.

III.4.3 Plasmodien-targets

III.4.3.1 Eradikation der Plasmodien

Bei der Dezimierung der Malariaerreger selbst sehen wir uns vielleicht mit geringerem ethischem Skrupel belegt, weshalb dieses Ziel zu diskutieren ist. Da Plasmodien ein vorwiegend haploides Genom aufweisen, wäre die Ausschaltung eines gewöhnlichen essentiellen Gens sofort letal, d. h. das Konstrukt hätte keine Möglichkeit sich auszubreiten. Diesem Problem würden wir durch die Attackierung eines Meiose-Gens begegnen, wobei wir den Homing-Prozess auf die post-meiotische synzytische Phase beschränken würden (Burt, 2003). Auf diese Weise blieben hemizygote Knockouts in ihrer Fitness unbeeinträchtigt und somit als Konduktoren funktionsfähig. Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige für die Meiose essentielle Zielgene. Wenn man die Formeln von Austin Burt (2003) zugrunde legt,

könnte man so theoretisch (Einschränkungen s. o.) eine Ausrottung in weniger als 20 Generationen erreichen.

An dieser Stelle sei kurz die Vorgehensweise erläutert, mit welcher unter Verwendung bioinformatischer Methoden nach neuen targets, z. B. in *Plasmodium*, gesucht wird:

1. Zunächst wird eine primäre Datenbank (in unserem Falle NCBI) nach Sequenzen durchsucht, welche meiotisch exprimiert werden.
2. Hierauf wird z. B. mithilfe von PlasmoDB sichergestellt, dass die in Frage kommenden Gene im Genom von *Plasmodium falciparum* vorkommen.
3. Es bleibt nun die Frage zu klären, ob die gefundenen Gene essentiell sind. Dies kann wiederum unter Verwendung der Datenbank PlasmoDB und anderer sekundärer Datenbanken (z. B. genetische Daten) beantwortet werden. Eine Domänenanalyse u. a. mit SMART ergibt auch Indizien für das Vorliegen eines essentiellen Gens (z. B. eine Kinase-Domäne, deren Homologe in anderen Organismen als essentiell bekannt sind).
4. Um mögliche Nebenwirkungen beim Menschen zu vermeiden, muss ausgeschlossen werden, dass sich im menschlichen Organismus verwandte Moleküle, insbesondere Zielsequenzen, finden. Dies wurde bei den Datenbanksuchen mit berücksichtigt, kann aber unabhängig durch Experimente abgesichert werden (Southern Analyse, PCR; high und low stringency).

Wie bereits diskutiert, bleibt jedoch Folgendes zu bedenken: Entstehen bei einem Ausrottungsversuch funktionelle Wirtsgene, welche von den egoistischen Genen nicht erkannt werden, so können sich Moskitos dieses Genotyps schnell ausbreiten, da sie mit keiner verbleibenden Konkurrenz zu ringen haben. Obgleich verschiedene Möglichkeiten existieren, die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von escape-Mutanten zu minimieren (s. o.; Attackierung multipler loci etc.), halten wir dennoch eine alternative Strategie für evolutionsstabiler.

III.4.3.2 Einführung einer milderen Plasmodien-Art

Anstatt die ursprüngliche Population (*Plasmodium falciparum*) auszurotten, soll diese durch eine in ihrer Virulenz gemilderte ersetzt werden.

Hierbei böte, für den Fall der Entstehung von escape-Mutanten, die neue Population diesen ausreichend Widerpart und würde sie durch die schnellere Ausbreitung (TDR) und geringere Schädigung des Wirtes komplett verdrängen.

Die ethischen und biologischen Vorzüge dieses milderen Eingriffs ins Ökosystem liegen auf der Hand. Die Verwirklichung dieses Vorhabens soll nun erläutert werden.

Humanisierung des GPI-Ankers

Wie gezeigt werden konnte, steht die Mortalität bei einer Malaria-tropica-Infektion in engem Zusammenhang mit einer systemischen und organspezifischen entzündlichen Reaktion, welche durch ein Parasitentoxin ausgelöst wird. Es handelt sich hierbei um Glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), welches interessanterweise dieselbe Rolle bei einer Infektion mit *Trypanosoma brucei* (Tachado und Schofield, 1994) und *T. cruzi* (Almeida et al., 2000) spielt.

Abb. 9 gibt einen kurzen Überblick über den Syntheseweg des Makromoleküls (Delorenzi et al., 2002; Kinoshita und Inoue, 2000; Eisenhaber et al., 2003).

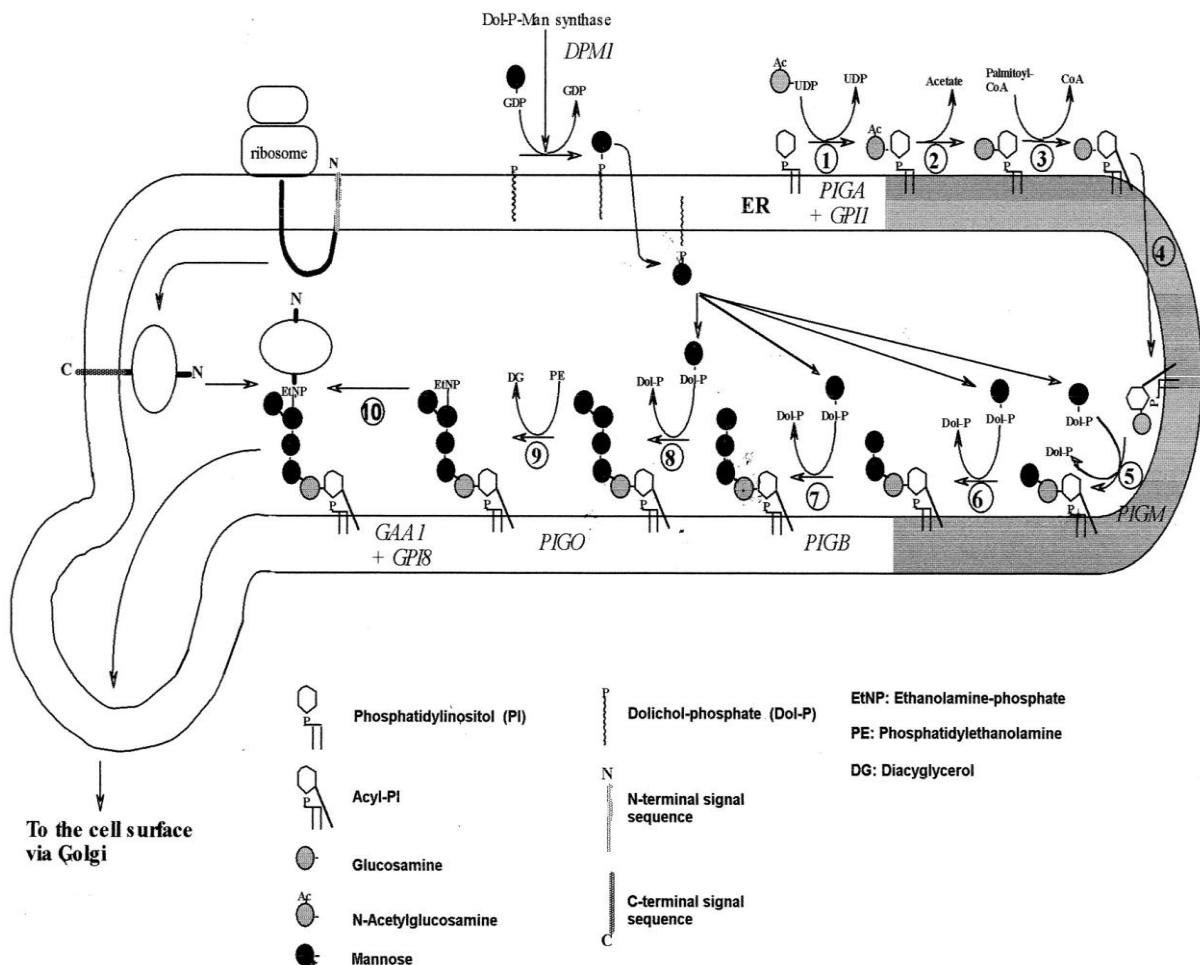


Abb. 9: Die Biosynthese des GPI-Ankers

1. Erzeugung von GlcNAc-PI aus UDP-GlcNAc und PI
 2. Deacetylierung zu GlcN-PI
 - 3., 4. Acylierung (für *P. falciparum* mit **Myristoyl-** anstelle des Palmitoylrestes) des Inositolrings, mit GlcN-acyl-PI als Produkt
 - 5., 6., 7., 8. viermalige Manosylierung des Substrats,
 9. Ankoppelung einer Ethanolaminphosphat-Seitenkette an den dritten Manoserest
 10. Verknüpfung mit dem Oberflächenprotein über letztgenannte Seitenkette
- nach Delorenzi et al., 2002

Ein essentieller Knockout in der Reaktionskette würde für hemizygoten Individuen den Tod bedeuten, da das Makromolekül für die Verankerung wichtiger Oberflächenproteine, wie z. B. circumsporozoitenprotein und merozoitenoberflächenproteine MSP1 u. MSP2, unentbehrlich ist. Aus diesem Grunde wird eine Modifikation angestrebt, welche die Oberflächeneigenschaft (antigene Eigenschaft) verändert bzw. abschwächt, ohne jedoch für die Funktion wichtige Struktureigenschaften in Mitleidenschaft zu ziehen. (Die möglicherweise daraus resultierende Notwendigkeit der Neueinführung einer stark antigen wirkenden Struktur, welche die vernichtete ausreichend als Antigen ersetzt, ist in Betracht zu ziehen.)

Bereits 1997 untersuchten Tachado et. al., auf welche GPI-Bestandteile die toxisch-allergische Reaktion zurückzuführen ist (Tachado et. al., 1997). Man fand Folgendes: Zwei voneinander unabhängige Signale kollaborieren bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aus der NF- κ B/rel-Familie, was zur Expression folgender abhängiger Loci führt: TNF, IL1, IL6, iNOS, interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, vaskuläres Adhäsionsmolekül 1. Diese Faktoren sind wesentlich an der Pathophysiologie einer schweren Malaria beteiligt. Die zwei erforderlichen Signale sind:

1. Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinase p59(hck) durch die konservierte Core-Glykan-Sequenz.
2. Aktivierung der PKC durch den Diacylglycerolanteil des GPIs.
(Alkylacylglycerol wie bei *Leishmania mexicana* hemmt im Gegensatz dazu die TNF-Produktion und die iNOS durch IFN-gamma aktivierter Makrophagen. - Auch menschliche GPIs tragen Alkylacylglycerol!)

Der Ersatz des Diacylglycerols im Plasmodien-GPI durch Alkylacylglycerol sollte demnach die überschießende Inflammationsreaktion im menschlichen Körper

verhindern. Zu diesem Zweck kann man die menschliche Alkylglyceron-phosphat-synthase (z. B. AGPS: E.C.Nr: 2.5.1.26) - wir setzen zunächst voraus, dass sich ein langkettiger Alkohol als notwendiges Substrat des Enzyms finden wird - und die 1-Acylglycerol-3-phosphat-O-acyltransferase (AGPAT1: E.C.Nr: 2.3.1.51) ins Plasmodiengenom einführen. Die bioinformatische Domänenanalyse und Homologiemodellierung für die beiden Enzyme sind in Box 1 ausgeführt. Abb. 14 zeigt den modifizierten Syntheseweg des Makromoleküls.

Box 1:

Die Domänen der beiden Proteine wurden mit SMART bzw. Pfam analysiert. Abb. 10 und Abb. 11 zeigen den Domänenaufbau.

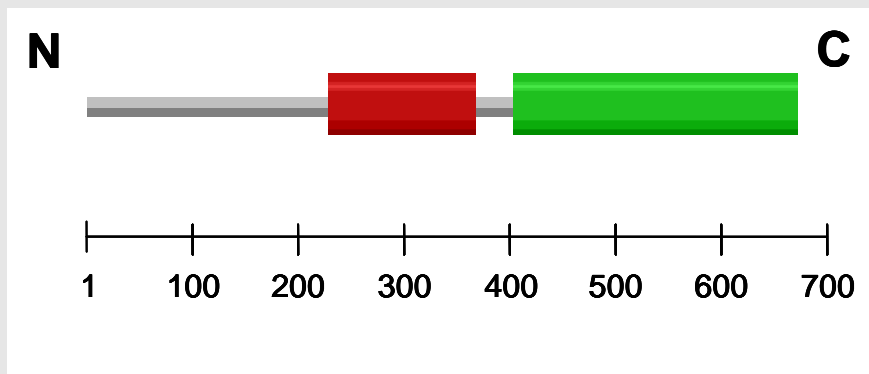


Abb. 10: Domänenanalyse der Alkylglyceron-phosphat-synthase

rot: FAD-bindende Domäne, grün: C-terminale, FAD-gekoppelte Oxidase-Domäne

Innerhalb der Sequenz von AGPS konnte eine FAD-bindende Domäne (rot: von AS [Aminosäure] 232 bis 374) und eine C-terminale, FAD-gekoppelte Oxidase-Domäne (grün: von AS 410 bis 683) identifiziert werden.

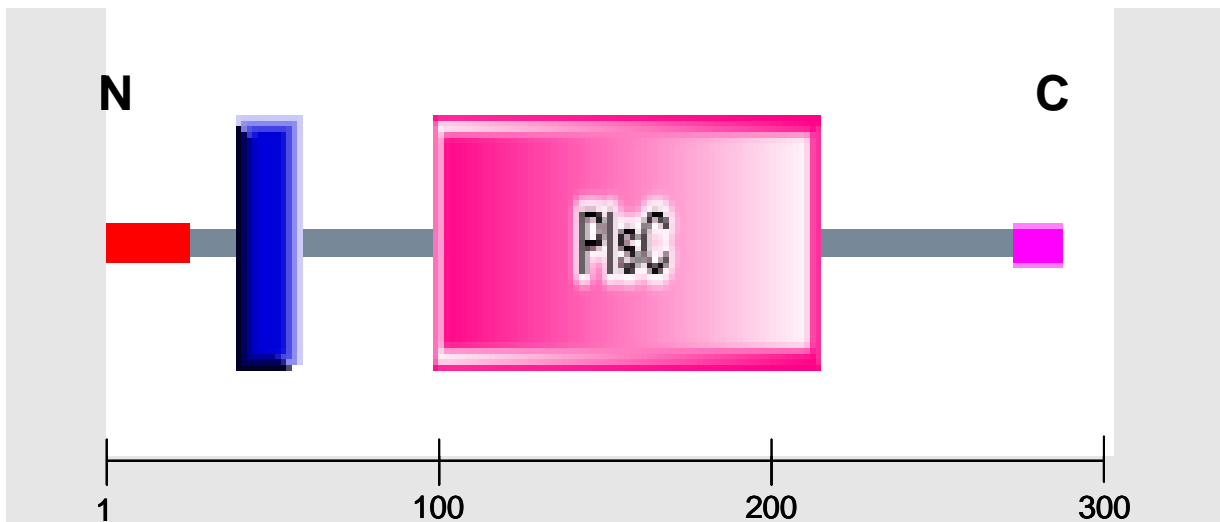


Abb. 11: Domänenanalyse der 1-Acylglycerol-3-phosphat-O-acyltransferase

PlsC: Phosphat-acyltransferase, blau: transmembranäres Segment, rot: Signalpeptid, rosa: Segment mit geringer Komplexität der Zusammensetzung

Gezeigt ist die Domänenstruktur von AGPAT1. Die PlsC-Domäne veranschaulicht eine Phosphat-acyltransferase, welche sich über die AS 98 bis 213 erstreckt. Blau ist ein transmembranäres Segment und rot ein Signalpeptid dargestellt. Das rosa markierte Rechteck steht für ein Segment mit geringer Komplexität der Zusammensetzung.

Mithilfe von AnDom war eine Strukturvorhersage anhand homologer Strukturdomänen möglich, nachdem dies durch Verwendung des SWISS MODEL Servers nicht gelungen war. Der Grund hierfür ist in der Tatsache zu suchen, dass AnDom im Gegensatz zu SWISS MODEL PSSMs für alle bekannten Strukturdomänen benutzt und aus diesen einzelnen Teildomänen eine Gesamtvorhersage generiert.

Die Aminosäuresequenz von AGPS (Länge: 684 AS) ist homolog zur Sequenz der Vanillyl-Alkohol-Oxidase von *Penicillium simplicissimum*. Der pdb code dieser template(Vorlage)-Struktur ist 1e8g. Die FAD-bindende Domäne (AS 6 – 273; SCOP-Klasse d.145.1.1) besteht aus 2 alpha+beta-Subdomänen. Die C-terminale, FAD-gekoppelte Oxidase-Domäne (AS 274 – 560; SCOP-Klasse d.58.32.1) weist eine Ferredoxin-ähnliche Faltung auf. Es handelt sich um ein alpha+beta-Sandwich mit antiparallelem beta-Faltblatt.

AGPAT1 (insgesamt 283 AS) weist von der AS 27 bis zur AS 267 Homologie zur Glycerol-3-phosphat-(1)-acyltransferase von *cucurbita moschata* auf. Der verwendete

pdb code des Enzyms lautet 1k30. Die Faltungsstruktur des Proteins setzt sich somit aus 3 Schichten (a/b/a) zusammen. Es handelt sich um gemischte Beta-Faltblätter aus 9 Strängen (Reihenfolge: 918736452; die Stränge 1, 2 und 8 sind antiparallel zu dem Rest).

Die Strukturen der homologen Proteine sind in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt. Beide 3D-Modelle wurden nach dem Auffinden mit dem Programm AnDom durch die Software RasMol visualisiert.

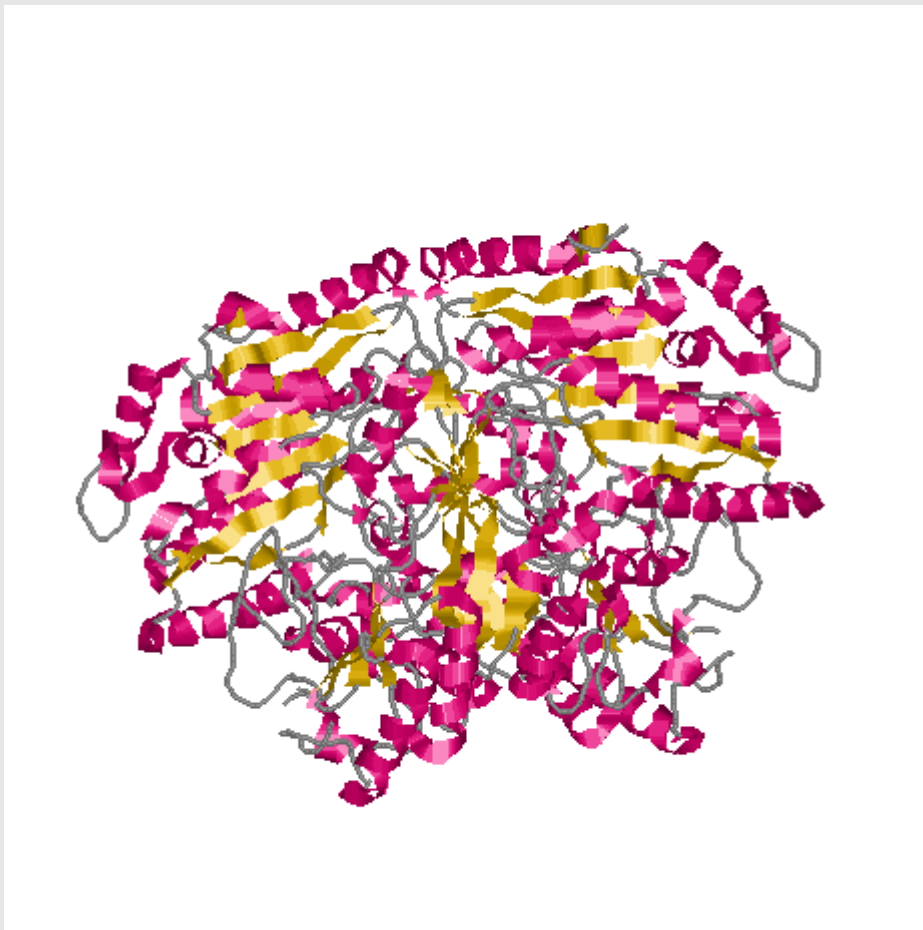


Abb. 12: Homologiemodell für die Alkylglyceron-phosphat-synthase



Abb. 13: Homologiemodell für die 1-Acylglycerol-3-phosphat-O-acyltransferase

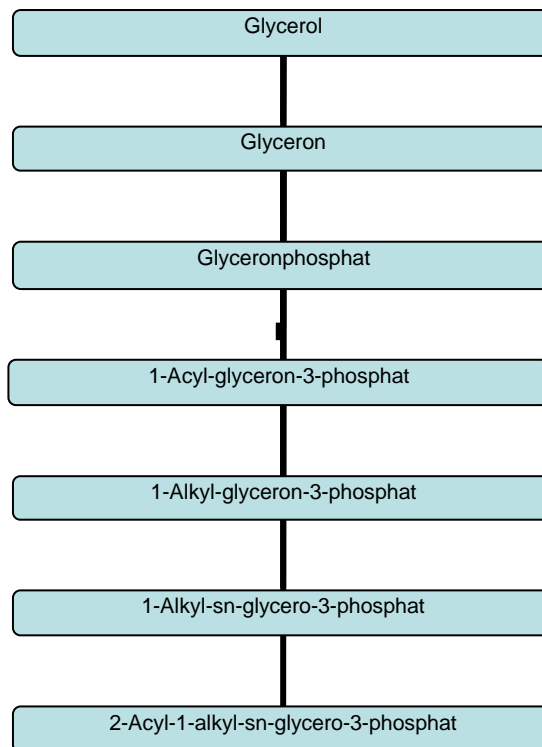


Abb. 14: Modifizierter Syntheseweg des Glycosyl-phosphatidylinositol-Ankers

Veranschaulicht werden die einzelnen Schritte des veränderten Syntheseweges mit den entsprechenden Zwischenprodukten.

Das Plasmodiengenom verfügt über mehrere vorhergesagte Glycerol-3-phosphat-dehydrogenasen-Gene (PF11_0157, PFL0780w, PFC0275w), weshalb der durch diese katalysierte Stoffwechselschritt, ebenso wie die Acylierung des Glyceronphosphats und die Reduktion von 1-alkyl-glyceron-3-phosphat, vorausgesetzt werden kann. Durch diese Manipulation würde der Weg zur Produktion von Alkylacylglycerol überexprimiert, worauf sich das Verhältnis von Alkylacylglycerol zu Diacylglycerol (DAG) im GPI-Anker auf die Seite des Ersteren verschöbe. In die Synthese des ursprünglichen Phosphatidylinositols, welches DAG enthält, würden wir wegen der mannigfaltigen Aufgaben des Stoffes im Organismus zunächst nicht eingreifen.

Der GPI-Syntheseweg bei Plasmodien ist gegenüber Säugerspezies nur vereinfacht angelegt ist. Aus dieser Tatsache ist ein weiterer Ansatzpunkt einer genetischen Manipulation abzuleiten.

Dem Manosylgruppentransfer muss in allen Spezies die Acylierung des Myoinositolrings vorausgehen (Säuger verwenden hierbei Palmitin-, Plasmodien jedoch Myristinsäure) (Gerold et al., 1999). Diese Fettsäure findet sich bei Säugern jedoch gewöhnlich nicht an membranständigen GPI-Ankern, was auf eine vorangegangene Deacylierung im endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen ist. Dieser Stoffwechselschritt fehlt bei Plasmodien, weshalb sich auf deren Zelloberfläche GPIs mit der erwähnten Acylgruppe finden. Da Endotoxinwirkungen meist mit der Fettsäurezusammensetzung des jeweiligen Substrats korrelieren, ist zu vermuten, dass jene additive Acylgruppe zusätzlich zu den oben erwähnten biochemischen Signalwegen, eine Aggravierung der Pathophysiologie der schweren Malaria bedingt (Warrell und Gilles, 2002). Da die Acylierung des Inositols wie bereits erwähnt essentiell für den Syntheseweg ist, darf sie auch nicht unterbunden werden, falls das Überleben der Plasmodien gewährleistet werden soll. Vor kurzem identifizierte man jedoch die beiden Enzyme, welche die Deacylierung bei Säugern bzw. Hefen bewerkstelligen: PGAP1 und Bst1p (Tanaka et al., 2004). In der Hoffnung, dass die Substratspezifität sich nicht auf den Palmitoylrest beschränkt, sondern sich auch auf den Myristoylrest erstreckt, kann eines dieser Gene ins Plasmodiengenom eingeführt werden, um deren GPIs zu humanisieren und somit die Toxinwirkung abzuschwächen.

Der Vollständigkeit wegen sei noch ein pharmakologisches target erwähnt, welches sich der Intervention aufgrund der Verschiedenheit der Syntheswege bei unterschiedlichen Spezies darbietet. Es handelt sich um das Enzym, welches die Myristoylierung des Inositolrings, die nur bei Plasmodien vorkommt, deren Realisierung jedoch unabdingbar für die GPI-Synthese ist, katalysiert (Gerold et al., 1999). Leider ist dieses Schlüsselenzym im größtenteils bekannten Syntheseweg des GPIs (vgl. Abb. 9 und [www. genome.ad.jp/kegg](http://www.genome.ad.jp/kegg)) noch unentdeckt.

Verhinderung der cerebralen Malaria

Die Pathophysiologie der cerebralen Malaria ist noch nicht im Detail aufgeklärt. Immunologische und inflammatorische Prozesse sind an der Entstehung dieser meistgefürchteten Komplikation beteiligt. Ein wichtiger Katalysator scheint der im vorigen Abschnitt erwähnte GPI-Anker zu sein, welcher bei der Ruptur von Schizonten frei wird (Warrell und Gilles, 2002).

Es gibt eindeutige Hinweise, dass auch mechanische Effekte eine wichtige Rolle spielen. Die Sequestration von infizierten Erythrozyten (PRBC – parasite-infected red blood cells) in den kleinen Hirngefäßen (Venolen) wird heute als maßgeblicher Triggerfaktor für die Entstehung der cerebralen Malaria angesehen. Die Adhäsion der Erythrozyten ans Endothel der Hirngefäße erfolgt rezeptorvermittelt. Verschiedene hierbei bedeutsame Rezeptoren auf den Endothelzellen konnten identifiziert werden (z. B. intracellular adhesion molecule 1: ICAM-1, CD 36 und Thrombospondin). Der wichtigste parasitenkodierte Ligand ist PfEMP-1. Die verschiedenen Gene (z. B. gi: 124803376), welche für das erwähnte Protein kodieren, könnten ausgeschaltet werden. Hierdurch ließe sich die cerebrale Malaria am ersten Glied der zugrunde liegenden komplizierten Kausalitätenkette beeinflussen bzw. verhindern.

Es bleibt festzuhalten, dass evolutionstechnisch betrachtet auf längere Sicht auch eine Reduktion der Moskitozahlen angestrebt werden sollte, um Superinfektionen mit verschiedenen Plasmodienstämmen vorzubeugen, denn in diesem Falle begünstigt der Selektionsdruck den virulentesten Erreger (Coluzzi, 1999).

IV. Diskussion

Die vorliegende Arbeit stellt einen innovativen genetischen Ansatz zur Bekämpfung der Malaria vor. Es wurden neuartige molekulargenetische Konstrukte entwickelt, welche eine effiziente und sichere Manipulation von natürlichen Vektor- und Plasmodien-Populationen erlauben. Die von uns entworfene molekulare Klonierungsstrategie für die Konstrukte wird derzeit am Biozentrum der Universität Würzburg in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Mikrobiologie (Professor Roy Gross) in *E. coli* umgesetzt und getestet. Auf den beschriebenen technischen Neuerungen aufbauend, wurde eine komplexe population-engineering-Strategie zur Eindämmung der Malaria beschrieben. Die Entwicklung der Strategie erfolgte mit bioinformatischen Methoden, wobei ebenfalls mathematische Modelle zur Vorhersage der Effizienz angewandt wurden.

Im Folgenden möchte ich auf die aktuellen Alternativen zu einer genetischen Intervention und damit auf konventionelle Strategien der Malariakontrolle eingehen.

IV.1 Alternative Ansätze: Pharmaka, Insektizide, Vakzinen

Es gibt noch einige andere Interventionsmethoden im Kampf gegen die Malaria, welche neben einer genetischen Manipulation auch attraktiv sind und deshalb nicht unerwähnt bleiben dürfen.

Repellents und insektizidbehandelte Moskitonetze (ITNs) (Curtis et al., 2006) sind weiterhin unverzichtbar als effizienter individueller Schutz vor einer Infektion. In diesem Zusammenhang ist besonders bemerkenswert, dass ITNs das Potential besitzen, sowohl die Prävalenz asymptomatischer Träger als auch die Population infizierter Moskitos und somit die Übertragungsrate zu reduzieren.

Besonderes Augenmerk ist auf eine Eindämmung der Vektorpopulationen zu legen. Der erste Gedanke in diesem Zusammenhang ist die Anwendung von Insektiziden. Eingedenk der Möglichkeit, dass der afrikanische Siegeszug des Hauptvektors, *Anopheles gambiae*, dessen Verbreitungsgebiet sich ursprünglich auf einige Feuchtsavannen beschränkte, erst durch menschliche Einflussnahme begann (Coluzzi, 1999), lassen sich zusätzlich alternative, vielleicht wirkungsvollere Strategien erwägen, um die Ausbreitung der Moskitos zu kontrollieren. Insbesondere sollte versucht werden, die Ausbreitung der Vektoren nicht weiter durch zunehmende Erderwärmung („global warming“) und Schaffung idealer Brutbedingungen durch Regenwaldabholzung aktiv zu befördern (Patz und Olson, 2006; Pasqual et al., 2006; Brown et al., 1998; Pearson, 2003). Auch das wohl gravierendste Problem unserer Zeit, die Überbevölkerung, hat nicht geringen Anteil an der Entstehung von parasitären Pestilenzen – man könnte soweit gehen zu behaupten, diese seien nichts weiter als ein Regulationsmechanismus der Natur, um jenes ökologische Ungleichgewicht zu beseitigen. Eigentlich sollte sich eine Wirtsschädigung, wie sie *P. falciparum* betreibt, ungünstig auf dessen eigenes Fortkommen auswirken. Wenn es jedoch gleichgültig ist, ob der Wirt getötet wird, da an ihm in keinem Fall Mangel herrschen kann, relativiert sich dieses Naturgesetz. Interessanterweise liefert die „child-survivor-Hypothese“ Hinweise darauf, dass eine deutliche Kindersterblichkeit durch Malaria zu einer überproportional gesteigerten Fertilität und damit zu einem weiter ansteigenden Bevölkerungswachstum führt (Sachs und Malaney, 2002). So schließt sich der Teufelskreis.

Als problematisch ist auch der zunehmende Anteil insektizidresistenter Moskitos zu betrachten. Dabei beschränken sich die Resistenzen nicht auf alte Wirkstoffe (z. B. DDT), sondern sind auch für neuere Chemikalien bekannt, wie u. a. für das weltweit meistverwendete Insektizid Pyrethroid, womit Moskitonetze imprägniert werden (Chandre et al., 1999; Etang et al., 2003).

Darüber hinaus sind in der jüngeren Vergangenheit einige molekularbiologische Strategien entwickelt worden, welche den Parasiten selbst bekämpfen sollen. Die unzweifelhaft beste pharmakologische Behandlungsoption der unkomplizierten Malaria stellen derzeit so genannte ACTs (artemisinin-combination therapies) dar, welche deshalb bereits in vielen Ländern als first-line-Therapie eingeführt wurden. Kurz wirksame Artemisinin-Derivate lassen sich leider kaum als Monotherapie verwenden, da es bei einer solchen Behandlung in mehr als einem Viertel der Fälle zu einem Wiederaufbrechen der Erkrankung kommt (Davis et al., 2005). Ihre Anwendung verlangsamt die zunehmende Resistenzentwicklung, senkt rasch eine bestehende Anämie und verringert vor allem die indirekte Infektiosität der Patienten (besonders in Bezug auf die Übertragung medikamentenresistenter Plasmodien), da die Gametozytenzahlen unter der neuen Behandlung schneller absinken (Guthmann et al., 2005; Sutherland et al., 2005). Auch in der Behandlung der schweren Malaria avancierten die Artemisinin-Derivate (besonders Artesunate parenteral) unlängst zum Goldstandard und verdrängten somit die klassischen Chinin-Derivate. Verglichen mit diesen ergab sich eine Senkung der Mortalität um mehr als ein Drittel (35%) bei einem wesentlich günstigeren Nebenwirkungsprofil (Pasvol et al., 2006).

Nachdem lange Zeit keinerlei Resistenzen gegenüber Artemisinin-Derivaten bekannt waren, wurden solche nun doch, vor allem in Französisch Guyana, nachgewiesen (Jambou et al., 2005). Auch in Südostasien sind Parasiten untersucht worden, deren Allelvarianten bestimmter Gene sie gegenüber Artemisininen resistent machen (Duffy und Sibley, 2005). In Sansibar konnte die Bedrohung durch einen möglichen alternativen Resistenzmechanismus gegenüber Lumefantrin-Artemether festgestellt werden (Duffy und Sibley, 2005; Edwards und Biagini, 2006). Obgleich die bestehenden Resistenzen noch nicht sehr stark ausgeprägt sind, könnte eine Kombination der verschiedenen Resistenzallele schon bald zur Entwicklung von *Falciparum-Plasmodien* führen, die einen hohen Grad an Resistenz aufweisen. In diesem Zusammenhang muss wiederum die gesteigerte Mobilität unserer Tage als

Risiko genannt werden. Die Studie von Afonso et al., 2006 unterstützt diese Hypothese. Sein Team konnte bei Nagetier-Plasmodien eine um den Faktor 16 erhöhte Resistenz nachweisen. Die alarmierende Resistenzentwicklung wird vor allem auf den unkontrollierten Einsatz von Artemisininpräparaten als Monotherapie oder in Kombination mit wenig effektiven Partnersubstanzen gesehen. Das Aufkommen starker Resistenzen gegenüber Artemisinen wäre eine medizinische Katastrophe, da derzeit keinerlei alternative Behandlungsoptionen bekannt sind.

Die Resistenzen betreffen alle derzeitigen und potentiellen Kombinationspartner (außer Methylenblau, s. o.). So wird beispielsweise Amodiaquin, welches bisher als äußerst effizienter Kombinationsstoff diente, diese Rolle nicht mehr lange einnehmen können, da gebietsweise bereits ca. 20% der Plasmodien resistent gegenüber diesem Medikament sind (Guthmann et al., 2005). Aus diesem Grund stellt sich schon heute die Frage nach einer neuen, effizienteren Alternative. Die derzeit getesteten Partnersubstanzen Chlorproguanil/Dapson, Pyronaridin und Piperaquin (Edwards und Biagini, 2006) stellen keine Lösung des Resistenzproblems dar.

Schließlich stellt die Finanzierung der Behandlung (ACTs sind etwa 10 bis 20mal teurer als Chloroquin) - neben anderen Hindernissen sozial-administrativer Natur - ein weiterhin ungelöstes Problem dar (Mutabingwa, 2005). Ähnliches gilt auch für die Bereitstellung von imprägnierten Moskitonetzen.

Außerdem wird seit den 1960er Jahren an der Entwicklung eines möglichen Impfstoffes gearbeitet. Einer der aussichtsreichsten und aktuellsten Ansätze entstand unter der Leitung Kai Matuschewskis (Mueller, Labaied et al., 2005; Mueller, Camargo et al., 2005): Es handelt sich um eine whole-organism-Vakzine, welche im Tiermodell erfolgreich vor einer Infektion bewahrt. Die Impfung bedingte sogar eine sterile Immunität, welche natürlicherweise (nach mehrmaliger Infektion mit wt-Plasmodien) nicht beobachtet wird. Der Impfstoff besteht aus genetisch modifizierten Parasiten (genetically attenuated parasites - GAPs), welche eine Deletion, das UIS3-Gen betreffend, aufweisen. Bisher wurden lediglich Versuche mit *Plasmodium berghei* – dem Überträger der Malaria bei Nagetieren - angestellt. Die Konsequenz besagten Knockouts sind Plasmodien, welche zwar immer noch Hepatozyten invadieren können, jedoch während ihrer Entwicklung im Leberstadium arretiert werden und unfähig sind, die Transformation in Leber-Schizonten auszuführen. Eine Infektion der Erythrozyten ist aus diesem Grunde kaum möglich. Es handelt sich also

um eine spezifische Immunisierung gegen präerythrozytäre Stadien. Da sich im Genom von *Plasmodium falciparum* ein orthologes Gen findet, glaubt man die Ergebnisse auf die humane Malaria übertragen zu können.

GAPs, welche wie in Tierstudien nur eine einzige Gendelektion aufweisen, werden jedoch als zu unsicher für die klinische Erprobung am Menschen angesehen, da solche GAPs im Tiermodell häufig Parasitämien verursachten (Mueller, Camargo et al., 2005). Schwerer noch wiegt die Tatsache, dass die Massenproduktion von GAPs derzeit noch nicht realisierbar ist. Grund hierfür ist das Fehlen eines *in-vitro*-Kultursystems für reife *Plasmodium-falciparum*-Sporozoiten. Bisher wurde die Impfung erst mit dem Modell-Parasiten *Plasmodium berghei* getestet. Diese Parasiten unterscheiden sich jedoch genetisch in einigen wesentlichen Aspekten von *Plasmodium falciparum* (vgl. weiter unten: Resistenzen gegen Melanisierungsreaktion in *Anopheles gambiae*).

Eine Mosaik-Vakzine (RTS,S von GlaxoKlineSmith) hat kürzlich bereits die Phase IIb der klinischen Erprobung durchlaufen (Matuschewski, 2006). Die Studie konnte dem Präparat einen bescheidenen Erfolg attestieren: Obgleich klinische Erkrankungen und schwere Verläufe verringert wurden, erwies sich die induzierte Immunität als zu kurzlebig und die Abwehrmechanismen als ungenügend (Hauptproblem von subunit-Vakzinen). Darüber hinaus wird eine Reihe anderer Immunisierungstargets diskutiert, deren Entwicklung jedoch meist weniger weit fortgeschritten ist (Matuschewski, 2006).

Die auch in den letzten Jahren stetig steigende Malaria-assoziierte Mortalität und Morbidität in Afrika südlich der Sahara lassen an der Hinlänglichkeit der vorgestellten konventionellen Strategien zweifeln. Obgleich dies zu hoffen wäre, werden all diese Ansätze wohl letztendlich nicht zu einer endgültigen Kontrolle des Problems führen. Vielmehr stellen sie einen Wettlauf mit dem Erreger und seiner Fähigkeit dar, immer neue Resistenzen zu entwickeln. Für eine dauerhafte Stabilisierung und Eindämmung der Plage ist unserer Meinung nach eine zusätzliche genetische Modifikationsstrategie von Nutzen bzw. aller Wahrscheinlichkeit nach unerlässlich.

IV.2 Alternative gene-drive-Systeme

Der Gedanke, Infektionskrankheiten durch genetische Manipulationen zu bekämpfen, ist nicht neu.

Seit klar wurde, dass sich genetisch veränderte Organismen in der Natur unter anderem aufgrund der oft beeinträchtigten Fitness und der Größe der in Frage kommenden Lebensräume ohne einen zusätzlichen drive-Mechanismus nicht durchsetzen können, ist man auf der Suche nach einem solchen (James, 2005; Cha et al., 2006). Obgleich einige Kandidaten aus der Gruppe der egoistischen DNA bereits seit längerem bekannt sind, ist bisher den verschiedenen Ansätzen kein entscheidender Erfolg beschieden worden. Dieser Umstand ist auf eine Reihe von Problemen zurückzuführen, welche in den Eigenschaften der jeweils verwendeten Elemente begründet sind.

Bei dem in der Vergangenheit meistdiskutierten drive-Mechanismus handelt es sich um die Gruppe der transposable elements, welche in der Molekulargenetik seit langem wohlbekannt ist und frühzeitig vor allem für den Gen-Transfer bei *Drosophila melanogaster* und anderen Insektenspezies genutzt wurde (Tu und Coates, 2004). Es werden zwei verschiedene Klassen unterschieden. Die meist für Keimbahn-Transformationen eingesetzten Elemente der Klasse 2 (z. B. *p element*, *Hermes*, *Minos*, *Mos1* und *piggy Bac*) nutzen für ihre Mobilität einen „cut and paste“-Mechanismus: Ein Transposase genanntes Enzym exzidiert das Transposon, schneidet die target-Region versetzt und fügt das Transposon an dieser Stelle in die Ziel-DNA ein. Homologe Reparaturmechanismen führen zu einer Vermehrung der Elemente im Genom. Der Einbau des Transposons in die DNA erfolgt meist sequenzunspezifisch.

Im Detail bisher noch ungeklärte Regulationsmechanismen verhindern nach erfolgter Fixierung eines bestimmten transposable elements seine weitere Transposition (Kidwell und Ribeiro, 1992; Kidwell und Lisch, 2002). Aus diesem Grunde können für die Transformation einer bestimmten target-Spezies nicht deren endogene transposable elements verwendet werden, sondern es muss hierbei auf speziesfremde Elemente ausgewichen werden. Des Weiteren folgt aus der erwähnten Tatsache, dass nach der Fixierung eines bestimmten transposable elements im Rahmen einer genetischen Manipulationsstrategie das gleiche Element nicht für einen zweiten Transformationsversuch verwandt werden kann (Kidwell und Ribeiro, 1992). Dementsprechend ist auch die Remobilisierungsrate in der Keimbahn

bei den meisten etablierten Elementen sehr gering (O'Brochta et al., 2003). Darüber hinaus sinkt mit der Größe der verwendeten Konstrukte deren Transpositionsfrequenz (Lampe et al., 1998). Deshalb würden sich mit einem Effektor-Gen beladene transposable elements wesentlich langsamer in der Zielpopulation ausbreiten. Aufgrund der Möglichkeit von Rekombinationen mit weiteren Kopien des Elements im Wirtsgenom wird zudem vermutet, dass transposable elements besonders anfällig sind für den Verlust ihres Effektor-Gens. Die durch transposable elements hervorgerufenen Genunterbrechungen und genomischen Umlagerungen gehen selten mit adaptiven Veränderungen einher, welche sogar zu einer gesteigerten Krankheitsübertragung führen könnten (Sinkins und Gould, 2006).

Das Hauptproblem besteht aber vielleicht in dem Umstand, dass es bei Verwendung von non site-specific (nicht ortsspezifischen) transposable elements unmöglich ist, den Phänotyp der transformierten Population vorherzusagen. Unter anderem ist dies durch die mögliche Veränderung der Genexpression des Effektor-Gens (abhängig von Positionseffekten und silencing) und durch Fitnessbeeinträchtigungen begründet, welche auf der Einfügung des transposable elements beruhen (Insertionsmutagenese) [Sinkins und Gould, 2006].

Eine Alternative zu transposable elements böte beispielsweise der meiotic drive genannte Mechanismus (Cha et al., 2006). Einige Gene (segregation distorters) hemmen die Entwicklung derjenigen Gameten, in deren Erbgut sie nicht enthalten sind. Somit sind diese Gene in einem Anteil von mehr als 50% der Gameten vertreten. Der segregation distorter besteht im einfachsten Falle aus nur zwei verbundenen loci: Der erste locus kodiert ein „Toxin“, der zweite (responder-Region) besteht aus dem resistenten Allel des targets. Das rivalisierende homologe Chromosom kodiert nicht für das „Toxin“, besitzt aber das sensible target-Allel.

Dennoch legen auch hierbei einige gewichtige Gründe den Gedanken nahe, dass der Ansatz in der Realität kaum funktionieren würde:

1. Viele Populationen sind von vornherein unsensibel für meiotic drive (Wood et al., 1977).
2. Der Mechanismus ist nicht übertragbar auf entfernter verwandte Spezies, da für diesen Fall nicht von konservierten responder-Regionen ausgegangen werden kann.

3. Auch endogene meiotic-drive-Systeme sind wohl in der Mehrzahl nicht von praktischem Wert, da autosomale drive-Gene den Responder bereits eliminiert bzw. gonosomale Gene Supressor-Gene selektiert hätten.

Für den aussichtsreichen Medea-Mechanismus (Sinkins und Gould, 2006) ist leider das zugrunde liegende Gen noch unbekannt. Außerdem ist es möglich, dass ein hierauf basierendes Verfahren nur in der originären Spezies (Tribolinum Käfer) funktionieren würde (Sinkins und Gould, 2006).

Underdominance bezeichnet ein weiteres Verfahren des gene drive. Natürlicherweise vorkommende Varianten dieses Systems wurden als unpraktikabel aufgegeben (Curtis 1968, Robinson 1976). Aber auch ein unlängst publizierteartifizielles Konstrukt (Abb. 15), welches auf demselben Mechanismus basiert, weist einige Schwachstellen bezüglich seiner Realisierbarkeit auf (Davis et al., 2001; Magori und Gould, 2006). Es ist sehr unwahrscheinlich, dass dieser relativ komplexe genetische Eingriff, wie postuliert, ohne jegliche Beeinträchtigung der Fitness einherginge. Außerdem würden bei einer denkbaren, nicht vollständigen Suppression der verwendeten toxischen Gene die ausgesetzten Moskitos getötet. Grundsätzlich ist festzuhalten, dass diese Methode niemals geeignet wäre, um riesige Populationen, welche etwa denen der Malariavektoren entsprächen, zu ersetzen. Hierfür müssten Frequenzen der ausgesetzten Moskitos von nahezu 30 Prozent erreicht werden, was schlichtweg unpraktikabel ist.

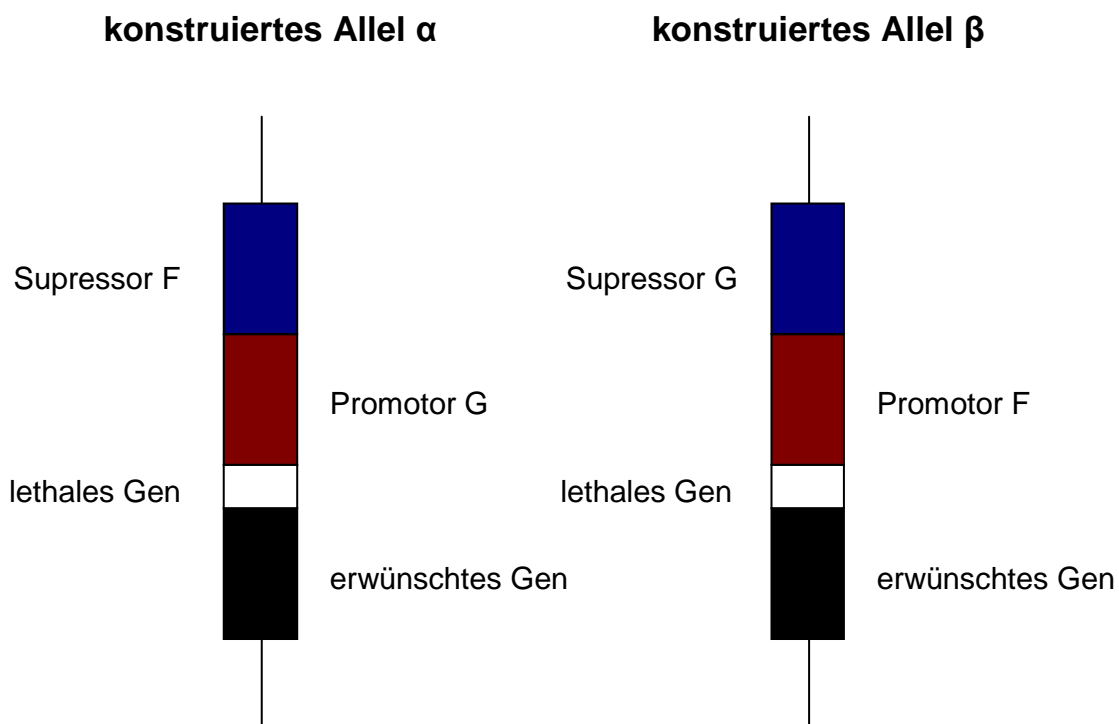


Abb. 15: Artifizielles Underdominance-Konstrukt

Die beiden Allele liegen auf zwei nicht homologen Chromosomen. Das eine Konstrukt inhibiert jeweils den Promotor des anderen, welcher die Transkription eines toxischen Gens kontrolliert. Die in die Zielpopulation neu einzuführenden Gene sind in den Konstrukten enthalten. Nachkommen aus Paarungen zwischen diesem künstlichen und wt-Stämmen sind nur lebensfähig, wenn sie entweder keines der beiden oder aber beide tragen.

Modifiziert nach Davis et al., 2001

Bei *Wolbachia* handelt es sich um mütterlich vererbte, intrazelluläre Bakterien, welche die Populationsdynamik ihrer Wirtsorganismen zu ihren eigenen Gunsten verändern und somit ständig in der Wirtspopulation an Frequenz zunehmen (Werren 1997). Dies geschieht z. B. über zytoplasmatische Inkompatibilität: Infizierte Weibchen genießen einen Reproduktionsvorteil gegenüber nicht infizierten, da sie sich mit allen Männchen erfolgreich paaren können. Die Eier nicht infizierter Weibchen hingegen können nur von nicht infizierten Spermien befruchtet werden.

Die in den letzten Jahren erreichte Erweiterung der molekulargenetischen Kenntnisse und die experimentellen Fortschritte bezüglich dieser Spezies lassen sie als interessanten alternativen drive-Mechanismus erscheinen (Wu et al., 2004; Xi et al., 2005; Xi et al., 2006; Sinkins und Gould, 2006). Dennoch ist auch diese Methode

nicht als gänzlich unproblematisch zu bezeichnen. Mit Effektorgenen verbundene Beeinträchtigungen der Fitness können nicht durch den Einsatz von gewebe- oder stadienspezifischen Promotoren vermindert werden. Außerdem ist derzeit noch kein geeigneter Sekretionsmechanismus verfügbar, welcher die Produkte der Effektorgene ins Zytoplasma der Moskitos transportieren könnte (besonders für die genetische Modifikation der Moskitos wurde die Nützlichkeit von Wolbachia bereits diskutiert). Außerdem kann eine ausreichende Infektion des Mitteldarms der Moskitos durch die Bakterien nicht vorausgesetzt werden. Die Funktionalität in Anopheles-Moskitos ist des Weiteren noch nicht erwiesen und die Ergebnisse zur Populationsdynamik in verschiedenen target-Spezies sind als uneinheitlich zu bezeichnen. Schließlich birgt Wolbachia eine nicht zu vernachlässigende ökologische Gefahr: Die Möglichkeit der horizontalen Übertragung zwischen verschiedenen Arthropoden-Spezies könnte das betreffende Ökosystem auf nicht vorhersehbare Weise beeinträchtigen (Werren, 1997).

IV.3 Diskussion wichtiger Neuerungen der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschreibt zwei neuartige Gen-Konversionskonstrukte bzw. drive-Mechanismen, welche sich aufgrund ihres nicht-Mendel'schen Vererbungsmodus rasch in Populationen ausbreiten. Ihre hervorstechende Charakteristik beruht auf ihrer Sequenzspezifität, Induzierbarkeit und unbeeinträchtigten Mobilität. Es werden approximative Voraussagen über die wahrscheinliche Verbreitung der Konstrukte in natürlichen Populationen gemacht. Für bestimmte Zielsetzungen (Ausrottung bzw. indirekte Geneinführung) liegen exakte Formeln bereits durch A. Burt (2003) vor. Die vorgeschlagenen drive-Systeme erlauben eine effiziente und sichere Modifikation natürlicher Populationen in Richtung des gewünschten Eigenschaftsprofils. Die meisten der im vorigen Abschnitt diskutierten Probleme alternativer Instrumente sind durch deren besondere Eigenschaften (Sequenzspezifität, Induzierbarkeit etc.) überwunden. Im Weiteren werden eine Reihe nützlicher Anwendungsmöglichkeiten erläutert, wie z. B. der Ersatz eines Gens durch ein neues.

- Im Genom von *Anopheles gambiae* konnte eine Vielzahl genetischer targets identifiziert werden, welche eine wirkungsvolle Refraktärität gegenüber *Plasmodium falciparum* vermitteln sollte. Es ist einzuräumen, dass unlängst Hinweise auf

vorhandene Resistenzen von *Plasmodium falciparum* bezüglich des erwähnten Melanisierungsprozesses gefunden wurden. Im Gegensatz zu dem für Versuchszwecke genutzten Nagerparasiten *Plasmodium berghei* hatte eine funktionelle Ausschaltung (durch RNA-Interferenz) von SRPN2 (Michel et al., 2006) bzw. LRIM1 und CTL4/CTLMA2 in Versuchen von Cohuet et al. (2006) offenbar keinen Einfluss auf die Entwicklung von *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. Diese Tatsache zeigt anschaulich, dass es nicht möglich ist, von modellhaften Laborversuchen ohne weiteres Schlüsse auf die komplexe Situation im Feld und vor Ort zu ziehen. Deshalb muss eine beabsichtigte genetische Intervention auch möglichst viele Ansatzpunkte und möglichst viele Daten von *Plasmodium falciparum* in Erwägung ziehen.

Für den Großteil der targets ist deshalb auch eine spezifische Wirksamkeit in Bezug auf *Plasmodium falciparum* erwiesen.

Es wurden in jüngster Vergangenheit eine Reihe von QTLs (quantitative trait loci), wie z. B. Pfin 1 und 2, im Genom von *Plasmodium falciparum* gefunden, welche für die Zukunft die Identifikation weiterer effizienter Resistenz-Allele versprechen (Niare et al., 2002; Menge et al., 2006; Riehle et al., 2006). Diese loci vermitteln in natürlichen *Anopheles-gambiae*-Populationen wirksame Resistenz gegenüber wt-*Plasmodium-falciparum*-Stämmen.

- Außerdem ermöglichen die von uns entwickelten drive-Mechanismen die Ausbreitung hochwirksamer künstlicher Resistenzgene (z. B. SM1-Peptid). In diesem Zusammenhang bereits veröffentlichte Manipulationsstrategien wurden von uns weiter ausgestaltet.

Die Erfolgsaussichten des Einsatzes genetisch veränderter resistenter Moskitos sind aktuell wesentlich optimistischer zu bewerten als noch in jüngster Vergangenheit, nachdem erstmals gezeigt werden konnte, dass resistente Moskitos unter parasitärischer Ernährung einen deutlichen Fitnessvorteil gegenüber wt-Organismen besitzen (Marrelli et al., 2007).

- Ein intelligenter Alternativansatz zu Fixierung natürlicher Resistenzgene wurde weiter verbessert, so dass dessen Implementierung nun weitaus realistischer erscheint.

- Eine Variante des Ansatzes wurde konstruiert, welche sich als wesentlich weniger anfällig in Bezug auf die Entstehung von escape-Mutanten darstellt.

- Der von Burt (2003) vorgeschlagene Ausrottungsversuch für Plasmodien wurde um zwei Meiose-targets erweitert.
- Eine konkrete Strategie für die Virulenzminderung natürlicher Plasmodien-Populationen wurde bisher nicht publiziert. In der vorliegenden Arbeit wird nunmehr eine solche, beruhend auf einer Humanisierung des GPI-Synthesewegs, präsentiert. Die einzelnen für die Implementierung der Strategie einzuführenden Gene werden vorgestellt.
- Darüber hinaus wird ein genetischer Eingriff beschrieben, der die Entstehung der besonders schwer verlaufenden cerebralen Malaria grundsätzlich verhindern könnte. Die Einführung in ihrer Virulenz abgeschwächter Parasiten erweist sich als wesentlich evolutionsstabiler als bereits beschriebene Eradikationsszenarien.
- Schließlich wenden wir aktuelle mathematische Modelle auf die Problematik der Resistenzentwicklung bezüglich neuer antiparasitärer Medikamente und Impfungen an.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass beide beschriebenen Gen-Konversionskonstrukte zur Patentierung angemeldet wurden. Die Anmeldung des Gruppe-II-Intron-Konstrukts (Patentanmeldung U30010 DPMA) erfolgte durch die Universität Würzburg, nachdem es von BayernPatent eingehend geprüft und empfohlen worden war. Die internationale PCT-Anmeldung wurde eingereicht (02.05.2007). Die andere Patentanmeldung (Aktenzeichen 102006029354.1) reichten Professor Dandekar und ich aus Prioritätsgründen privat ein (eine Prüfung durch BayernPatent hätte die Einreichung kritisch verzögert). Was die wirtschaftliche Vermarktung der beiden Patente anbetrifft, stehen wir derzeit in Verhandlungen mit der Firma SIGMA Aldrich (St. Louis, USA), welche deutliches Interesse an den geschützten Technologien signalisierte.

Schließlich reichten wir unlängst ein Manuskript zum abgehandelten Thema bei dem Journal „Genome Biology“ ein (Löwe, Philippi, Sauerborn, Dandekar, A refined genome engineering strategy against parasites and vectors: an application for malaria control).

V. Zusammenfassung

Das Scheitern konventioneller Ansätze zur Bekämpfung der Malaria beruht vor allem auf der raschen Entstehung von Resistenzen gegenüber antiparasitären bzw. insektiziden Wirkstoffen und Impfungen. Diese Hypothese wird zunächst durch Modellrechnungen veranschaulicht.

In der vorliegenden Arbeit haben wir unter Nutzung bioinformatischer Methoden eine innovative Strategie zur Eindämmung der Malaria entwickelt. Die genetische Modifikationsstrategie beinhaltet sowohl Manipulationen aufseiten des gefährlichsten Erregers, *Plasmodium falciparum*, als auch des Hauptvektors, *Anopheles gambiae*. In den Genomen beider Spezies wurden eine Reihe neuer konkreter targets identifiziert. Auch bereits beschriebene targets und Ansätze wurden in die Strategie einbezogen bzw. weiter ausgestaltet.

Bezüglich der Vektormoskitos wird die Verbreitung eines gegenüber Plasmodien resistenten Genotyps angestrebt. Es werden einerseits effiziente natürliche und künstliche Resistenzgene diskutiert und andererseits eine bekannte Strategie zur Fixierung natürlicher Resistenzallele in natürlichen Populationen verbessert.

Auf der Seite der Plasmodien erweiterten wir einen bereits von A. Burt (2003) beschriebenen Eradikationsansatz um weitere targets. Aus ethischen und evolutionsbiologischen Erwägungen bevorzugen wir jedoch eine alternative Strategie, welche die Etablierung von in ihrer Virulenz gemilderten Parasiten zum Ziel hat. Der attenuierte Genotyp wird unter anderem durch komplexe Pathway-Remodellierungen beschrieben (Löwe, Philippi, Sauerborn, Dandekar, A refined genome engineering strategy against parasites and vectors: an application for malaria control, Manuskript beim Journal „Genome Biology“ eingereicht).

Da sich Mutanten in der Natur gegen Wildtyp-Organismen kaum durchsetzen können, werden zwei drive-Systeme beschrieben, welche für die Implementierung der genetischen Manipulationsstrategie entwickelt wurden. Beide Konstrukte wurden zur Patentierung angemeldet (Patentanmeldung U30010 DPMA bzw. Aktenzeichen 102006029354.1). Zusätzlich zur deutschen wurde für eines der beiden Konstrukte eine PCT-Anmeldung eingereicht, welche in Zukunft einen internationalen Patentschutz ermöglichen soll.

Es werden Kalkulationen vorgelegt, welche die Verbreitungstendenzen der Konstrukte in natürlichen Populationen vorhersagen. Die Beschreibung der entwickelten Konstrukte beschränkt sich nicht auf das primäre Anwendungsgebiet der Arbeit (Malaria), sondern beinhaltet auch andere Anwendungsgebiete, vor allem im Bereich der Medizin und Molekularbiologie.

Literatur

Afonso A, Hunt P, Cheesman S, Alves AC, Cunha CV, do Rosario V, Cravo P.
Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*.
Antimicrob Agents Chemother. 2006 Feb;50(2):480-9.

Akoachere M, Buchholz K, Fischer E, Burhenne J, Haefeli WE, Schirmer RH, Becker K.
In vitro assessment of methylene blue on chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* strains reveals synergistic action with artemisinins.
Antimicrob Agents Chemother. 2005 Nov;49(11):4592-7.

Almeida IC, Camargo MM, Procopio DO, Silva LS, Mehlert A, Travassos LR, Gazzinelli RT, Ferguson MA.
Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents.
EMBO J. 2000 Apr 3;19(7):1476-85.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.
Basic local alignment search tool.
J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402. Review.

Ashworth J, Havranek JJ, Duarte CM, Sussman D, Monnat RJ Jr, Stoddard BL, Baker D.
Computational redesign of endonuclease DNA binding and cleavage specificity.
Nature. 2006 Jun 1;441(7093):656-9.

Bairoch A.

The ENZYME database in 2000.

Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):304-5.

Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR.

The Pfam protein families database.

Nucleic Acids Res. 2004 Jan 1;32

Belfort, M., Derbyshire, V., Parker, M.,M., Cousineau, B. & Lambowitz, A. M.

2002 Mobile introns: pathways and proteins. In Mobile DNA II (ed. N. L. Craig, R. Craigie, M. Gellert & A. M. Lambowitz), pp. 761-783. Washington, DC: ASM Press.

Bellaiche Y, Mogila V, Perrimon N.

I-SceI endonuclease, a new tool for studying DNA double-strand break repair mechanisms in *Drosophila*.

Genetics. 1999 Jul;152(3):1037-44.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL.

GenBank.

Nucleic Acids Res. 2007 Jan;35(Database issue):D21-5.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE.

The Protein Data Bank.

Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):235-42.

Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, Chandrasegaran S.

Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases.

Mol Cell Biol. 2001 Jan;21(1):289-97.

Blandin S, Levashina EA.

Mosquito immune responses against malaria parasites.

Curr Opin Immunol. 2004 Feb;16(1):16-20.

Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, Levashina EA.

Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*.

Cell. 2004 Mar 5;116(5):661-70.

Brown V, Abdir Issak M, Rossi M, Barboza P, Paugam A.

Epidemic of malaria in north-eastern Kenya.

Lancet. 1998 Oct 24;352(9137):1356-7.

Buchholz F, Stewart AF.

Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution.

Nat Biotechnol. 2001 Nov;19(11):1047-52.

Burt A.

Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations.

Proc Biol Sci. 2003 May 7;270(1518):921-8.

Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A.

Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*.

Nature. 2000 Jun 22;405(6789):959-62.

Cha SJ, Mori A, Chadee DD, Severson DW.

Cage trials using an endogenous meiotic drive gene in the mosquito *Aedes aegypti* to promote population replacement.

Am J Trop Med Hyg. 2006 Jan;74(1): 62-8.

Chandrasegaran S, Smith J.

Chimeric restriction enzymes: what is next?

Biol Chem. 1999 Jul-Aug;380(7-8):841-8. Review.

Chandre F, Darrier F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P.

Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*.

Bull World Health Organ. 1999;77(3):230-4.

Chevalier, B.S. & Stoddard, B.L. 2001

Homing endonucleases: structural and functional insights into the catalysts of intron/intein mobility.

Nucleic Acids Res. 29, 3757-3774.

Chevalier BS, Kortemme T, Chadsey MS, Baker D, Monnat RJ, Stoddard BL.

Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease.

Mol Cell. 2002 Oct;10(4):895-905.

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Muller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC.

Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*.

Science. 2002 Oct 4;298(5591):159-65.

Cohuet A, Osta MA, Morlais I, Awono-Ambene PH, Michel K, Simard F,

Christophides GK, Fontenille D, Kafatos FC.

Anopheles and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field.

EMBO Rep. 2006 Dec;7(12):1285-9.

Collins FH, Sakai RK, Vernick KD, Paskewitz S, Seeley DC, Miller LH, Collins WE, Campbell CC, Gwadz RW.

Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector

Anopheles gambiae.

Science. 1986 Oct 31;234(4776):607-10.

Coluzzi M.

The clay feet of the malaria giant and its African roots: hypotheses and inferences about origin, spread and control of Plasmodium falciparum.

Parassitologia. 1999 Sep;41(1-3):277-83. Review.

Curtis CF.

Possible use of translocations to fix desirable genes in insect pest populations.

Nature. 1968 Apr 27;218(5139):368-9.

Curtis CF, Graves PM.

Methods for replacement of malaria vector populations.

J Trop Med Hyg. 1988 Apr;91(2):43-8. Review.

Curtis CF, Maxwell CA, Magesa SM, Rwegoshora RT, Wilkes TJ.

Insecticide-treated bed-nets for malaria mosquito control.

J Am Mosq Control Assoc. 2006 Sep;22(3):501-6. Review.

Dandekar T, Schuster S, Snel B, Huynen M, Bork P.

Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes.

Biochem J. 1999 Oct 1;343 Pt 1:115-24.

Davis S, Bax N, Grewe P.

Engineered underdominance allows efficient and economical introgression of traits into pest populations.

J Theor Biol. 2001 Sep 7;212(1):83-98.

Davis TM, Karunajeewa HA, Ilett KF.

Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria.

Med J Aust. 2005 Feb 21;182(4):181-5.

Delorenzi M, Sexton A, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Speed T, Schofield L.
Genes for glycosylphosphatidylinositol toxin biosynthesis in *Plasmodium falciparum*.

Infect Immun. 2002 Aug;70(8):4510-22.

Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G.

Anopheles gambiae immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species.

PLoS Pathog. 2006 Jun;2(6):e52.

Donoho G, Jasin M, Berg P.

Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells.

Mol Cell Biol. 1998 Jul;18(7):4070-8.

Duffy PE, Sibley CH.

Are we losing artemisinin combination therapy already?

Lancet. 2005 Dec 3;366(9501):1908-9.

Edwards G, Biagini GA.

Resisting resistance: dealing with the irrepressible problem of malaria.

Br J Clin Pharmacol. 2006 Jun;61(6):690-3. Review.

Eisenhaber B, Maurer-Stroh S, Novatchkova M, Schneider G, Eisenhaber F.

Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins.

Bioessays. 2003 Apr;25(4):367-85. Review.

Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D.

Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon.

J Med Entomol. 2003 Jul;40(4):491-7.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.
Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in
Caenorhabditis elegans.
Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

Franz AW, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, Olson
KE.
Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in
genetically modified *Aedes aegypti*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4198-203.

Frazier CL, San Filippo J, Lambowitz AM, Mills DA.
Genetic manipulation of *Lactococcus lactis* by using targeted group II introns:
generation of stable insertions without selection.
Appl Environ Microbiol. 2003 Feb;69(2):1121-8.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, et al.
Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.
Nature. 2002 Oct 3;419(6906):498-511.

Gaudermann P, Vogl I, Zientz E, Silva FJ, Moya A, Gross R, Dandekar T.
Analysis of and function predictions for previously conserved hypothetical or
putative proteins in *Blochmannia floridanus*.
BMC Microbiol. 2006 Jan 9;6:1.

Gerold P, Jung N, Azzouz N, Freiberg N, Kobe S, Schwarz RT.
Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum* in a
cell-free incubation system: inositol acylation is needed for mannosylation of
glycosylphosphatidylinositols.
Biochem J. 1999 Dec 15;344 Pt 3:731-8.

Greenwood B, Mutabingwa T.
Malaria in 2002.

Nature. 2002 Feb 7;415(6872):670-2. Review.

Guo H, Karberg M, Long M, Jones JP 3rd, Sullenger B, Lambowitz AM.
Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells.

Science. 2000 Jul 21;289(5478):452-7.

Guthmann JP, Ampuero J, Fortes F, van Overmeir C, Gaboulaud V, Tobback S, Dunand J, Saraiva N, Gillet P, Franco J, Denoncin A, van Herp M, Balkan S, Dujardin JC, D'Alessandro U, Legros D.

Antimalarial efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and the combinations of amodiaquine + artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine + artesunate in Huambo and Bie provinces, central Angola.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005 Jul;99(7):485-92.

Hahn MW, Nuzhdin SV.

The fixation of malaria refractoriness in mosquitoes.

Curr Biol. 2004 Apr 6;14(7):R264-5.

Hastings IM.

Selfish DNA as a method of pest control.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1994 May 28;344(1309):313-24.

Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, et al.

The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.

Science. 2002 Oct 4;298(5591):129-49.

Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M.

Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite.

Nature. 2002 May 23;417(6887):452-5.

Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, Ekala MT, Bouchier C, Esterre P, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O.

Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and

point mutations of the SERCA-type PfATPase6.
Lancet. 2005 Dec 3;366(9501):1960-3.

James AA.
Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road.
Trends Parasitol. 2005 Feb;21(2): 64-7. Review.

Kaiser J.
Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial.
Science. 2003 Jan 24;299(5606):495.

Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Nakaya A.
The KEGG databases at GenomeNet.
Nucleic Acids Res. 2002 Jan 1;30(1):42-6.

Karberg M, Guo H, Zhong J, Coon R, Perutka J, Lambowitz AM.
Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic
manipulation of bacteria.
Nat Biotechnol. 2001 Dec;19(12):1162-7.

Khasnis AA, Nettleman MD.
Global warming and infectious disease.
Arch Med Res. 2005 Nov-Dec;36(6):689-96. Review.

Kidwell MG, Ribeiro JM.
Can transposable elements be used to drive disease refractoriness genes into
vector populations?
Parasitol Today. 1992 Oct;8(10):325-9

Kidwell, M.G. & Lisch, D.R. in Mobile DNA II
(ed. N. L. Craig, R. Craigie, M. Gellert & A. M. Lambowitz), pp. 59-90. Washington,
DC: ASM Press. 2002

Kim W, Koo H, Richman AM, Seeley D, Vizioli J, Klocko AD, O'Brochta DA. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *J Med Entomol*. 2004 May;41(3):447-55.

Kinoshita T, Inoue N.

Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis.

Curr Opin Chem Biol. 2000 Dec;4(6):632-8. Review.

Kirik A, Salomon S, Puchta H.

Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants.

EMBO J. 2000 Oct 16;19(20):5562-6.

Kissinger JC, Brunk BP, Crabtree J, Fraunholz MJ, Gajria B, Milgram AJ, Pearson DS, Schug J, Bahl A, Diskin SJ, Ginsburg H, Grant GR, Gupta D, Labo P, Li L, Mailman MD, McWeeney SK, Whetzel P, Stoeckert CJ, Roos DS.

The *Plasmodium* genome database.

Nature. 2002 Oct 3;419(6906):490-2.

Knipling EF, Laven H, Craig GB, Pal R, Kitzmiller JB, Smith CN, Brown AW.

Genetic control of insects of public health importance.

Bull World Health Organ. 1968;38(3):421-38.

Lampe DJ, Grant TE, Robertson HM.

Factors affecting transposition of the Himar1 mariner transposon in vitro.

Genetics. 1998 May;149(1):179-87.

Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P.

SMART 5: domains in the context of genomes and networks.

Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34

Magori K, Gould F.

Genetically engineered underdominance for manipulation of pest populations: a

deterministic model.

Genetics. 2006 Apr;172(4):2613-20. Epub 2006 Jan 16.

Marrelli MT, Li C, Rasgon JL, Jacobs-Lorena M.

Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on Plasmodium-infected blood.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 19;

Matsuura M, Saldanha R, Ma H, Wank H, Yang J, Mohr G, Cavanagh S, Dunny GM, Belfort M, Lambowitz AM.

A bacterial group II intron encoding reverse transcriptase, maturase, and DNA endonuclease activities: biochemical demonstration of maturase activity and insertion of new genetic information within the intron.

Genes Dev. 1997 Nov 1;11(21):2910-24.

Matuschewski K.

Vaccine development against malaria.

Curr Opin Immunol. 2006 Aug;18(4):449-57. Epub 2006 Jun 12. Review.

McPherson MJ

PCR

S. Moller Springer-Verlag Telos (Oktober 2000)

Meissner PE, Mandi G, Witte S, Coulibaly B, Mansmann U, Rengelshausen J, Schiek W, Jahn A, Sanon M, Tapsoba T, Walter-Sack I, Mikus G, Burhenne J, Riedel KD, Schirmer H, Kouyate B, Muller O.

Safety of the methylene blue plus chloroquine combination in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young children of Burkina Faso [ISRCTN27290841].

Malar J. 2005 Sep 22;4:45.

Meissner PE, Mandi G, Coulibaly B, Witte S, Tapsoba T, Mansmann U, Rengelshausen J, Schiek W, Jahn A, Walter-Sack I, Mikus G, Burhenne J, Riedel KD, Schirmer RH, Kouyate B, Muller O.

Methylene blue for malaria in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine.

Malar J. 2006 Oct 8;5:84.

Menge DM, Zhong D, Guda T, Gouagna L, Githure J, Beier J, Yan G.
Quantitative trait loci controlling refractoriness to *Plasmodium falciparum* in natural *Anopheles gambiae* mosquitoes from a malaria-endemic region in western Kenya.

Genetics. 2006 May;173(1):235-41.

Michel K, Kafatos FC.

Mosquito immunity against *Plasmodium*.

Insect Biochem Mol Biol. 2005 Jul;35(7):677-89.

Michel K, Suwanchaichinda C, Morlais I, Lambrechts L, Cohuet A, Awono-Ambene PH, Simard F, Fontenille D, Kanost MR, Kafatos FC.

Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 7;103(45):16858-63.

Monnat RJ Jr, Hackmann AF, Cantrell MA.

Generation of highly site-specific DNA double-strand breaks in human cells by the homing endonucleases I-PpoI and I-CreI.

Biochem Biophys Res Commun. 1999 Feb 5;255(1):88-93.

Moreira LA, Wang J, Collins FH, Jacobs-Lorena M.

Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development.

Genetics. 2004 Mar;166(3):1337-41

Mueller AK, Labaied M, Kappe SH, Matuschewski K.

Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine.

Nature. 2005 Jan 13;433(7022):164-7.

Mueller AK, Camargo N, Kaiser K, Andorfer C, Frevert U, Matuschewski K, Kappe SH.

Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 22;102(8):3022-7.

Mutabingwa TK.

Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy!

Acta Trop. 2005 Sep;95(3):305-15. Review.

Niare O, Markianos K, Volz J, Oduol F, Toure A, Bagayoko M, Sangare D, Traore SF, Wang R, Blass C, Dolo G, Bouare M, Kafatos FC, Kruglyak L, Toure YT, Vernick KD.

Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population.

Science. 2002 Oct 4;298(5591):213-6.

Nienhuis AW, Dunbar CE, Sorrentino BP.

Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells.

Mol Ther. 2006 Jun;13(6):1031-49. Epub 2006 Apr 19. Review.

O'Brochta DA, Sethuraman N, Wilson R, Hice RH, Pinkerton AC, Levesque CS, Bideshi DK, Jasinskiene N, Coates CJ, James AA, Lehane MJ, Atkinson PW.

Gene vector and transposable element behavior in mosquitoes.

J Exp Biol. 2003 Nov;206(Pt 21):3823-34. Review.

Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC.

Effects of mosquito genes on Plasmodium development.

Science. 2004 Mar 26;303(5666):2030-2.

Pascual M, Ahumada JA, Chaves LF, Rodo X, Bouma M.

Malaria resurgence in the East African highlands: temperature trends revisited.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 11;103(15):5829-34.

Pasvol G.

The treatment of complicated and severe malaria.

Br Med Bull. 2006 Feb 22;75-76:29-47.

Patz JA, Olson SH.

Malaria risk and temperature: influences from global climate change and local land use practices.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 11;103(15):5635-6.

Pearson H

Lost forest fuels malaria:

in Nature science update (11-2003)

Perutka J, Wang W, Goerlitz D, Lambowitz AM.

Use of computer-designed group II introns to disrupt Escherichia coli DExH/D-box protein and DNA helicase genes.

J Mol Biol. 2004 Feb 13;336(2):421-39.

Posfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, Blattner FR.

Markerless gene replacement in Escherichia coli stimulated by a double-strand break in the chromosome.

Nucleic Acids Res. 1999 Nov 15;27(22):4409-15.

Riehle MM, Markianos K, Niare O, Xu J, Li J, Toure AM, Podiougou B, Oduol F, Diawara S, Diallo M, Coulibaly B, Ouatarra A, Kruglyak L, Traore SF, Vernick KD. Natural malaria infection in Anopheles gambiae is regulated by a single genomic control region.

Science. 2006 Apr 28;312(5773):577-9.

Robinson AS.

Progress in the use of chromosomal translocations for the control of insect pests.

Biol Rev Camb Philos Soc. 1976 Feb;51(1):1-24. Review.

Rong YS, Golic KG.

Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*.

Science. 2000 Jun 16;288(5473):2013-8.

Rong YS, Titen SW, Xie HB, Golic MM, Bastiani M, Bandyopadhyay P, Olivera BM, Brodsky M, Rubin GM, Golic KG.

Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*.

Genes Dev. 2002 Jun 15;16(12):1568-81.

Rosen LE, Morrison HA, Masri S, Brown MJ, Springstubb B, Sussman D, Stoddard BL, Seligman LM.

Homing endonuclease I-CreI derivatives with novel DNA target specificities. Nucleic Acids Res. 2006;34(17):4791-800.

Sachs J, Malaney P.

The economic and social burden of malaria.

Nature. 2002 Feb 7;415(6872):680-5. Review.

Sambrook J, Russell DW

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol.

Cold Spring Harbor Laboratory Press (January 2001), Cold Spring Harbor, N.Y.

Santoro SW, Schultz PG.

Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 2;99(7):4185-90.

Saraf-Levy T, Santoro SW, Volpin H, Kushnirsky T, Eyal Y, Schultz PG, Gidoni D, Carmi N.

Site-specific recombination of asymmetric lox sites mediated by a heterotetrameric Cre recombinase complex.

Bioorg Med Chem. 2006 May 1;14(9):3081-9.

Schmidt S, Bork P, Dandekar T.

A versatile structural domain analysis server using profile weight matrices.

J Chem Inf Comput Sci. 2002 Mar-Apr;42(2):405-7.

Schug J.

Using Tess to Predict Transcription Factor Binding Sites in DNA Sequence
in Current Protocols in Bioinformatics

(ed. Baxevanis A), J. Wiley and sons, 2003

Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC.

SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server.

Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1;31(13):3381-5.

Segal DJ, Dreier B, Beerli RR, Barbas CF 3rd.

Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger
domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 16;96(6):2758-63.

Seligman, L.M., Stephens, K.M., Savage, J.H., and Monnat, R.J., Jr(1997)

Genetic analysis of the Chlamydomonas reinhardtii I-Cre I mobile intron homing
system in Escherichia coli. Genetics, 147, 1653-1664.

Seligman LM, Chisholm KM, Chevalier BS, Chadsey MS, Edwards ST, Savage JH,
Veillet AL.

Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease.

Nucleic Acids Res. 2002 Sep 1;30(17):3870-9.

Sinkins SP, Gould F.

Gene drive systems for insect disease vectors.

Nat Rev Genet. 2006 Jun;7(6):427-35. Review.

Sutherland CJ, Ord R, Dunyo S, Jawara M, Drakeley CJ, Alexander N, Coleman
R, Pinder M, Walraven G, Targett GA.

Reduction of Malaria Transmission to Anopheles Mosquitoes with a Six-Dose

Regimen of Co-Artemether.

PLoS Med. 2005 Apr;2(4):e92.

Tachado SD, Schofield L.

Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Trypanosoma brucei* regulates IL-1 alpha and TNF-alpha expression in macrophages by protein tyrosine kinase mediated signal transduction.

Biochem Biophys Res Commun. 1994 Dec 15;205(2):984-91.

Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville M, Schofield L.

Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 15;94(8):4022-7.

Takahashi H, Fujiwara H.

Transplantation of target site specificity by swapping the endonuclease domains of two LINEs.

EMBO J. 2002 Feb 1;21(3):408-17.

Tanaka S, Maeda Y, Tashima Y, Kinoshita T.

Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p.

J Biol Chem. 2004 Apr 2;279(14):14256-63.

Topalis P, Koutsos A, Dialynas E, Kiamos C, Hope LK, Strode C, Hemingway J, Louis C.

AnoBase: a genetic and biological database of anophelines.

Insect Mol Biol. 2005 Dec;14(6):591-7.

Tu Z, Coates C.

Mosquito transposable elements.

Insect Biochem Mol Biol. 2004 Jul;34(7):631-44. Review.

Warrell DA & Gilles HM.
Essential Malariology
Arnold, London, 2002

Werner T.
The state of the art of mammalian promoter recognition.
Brief Bioinform. 2003 Mar;4(1):22-30. Review.

Werren JH.
Biology of Wolbachia.
Annu Rev Entomol. 1997;42:587-609.

White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Marsh K, Snow RW, Kokwaro G, Ouma J, Hien TT, Molyneux ME, Taylor TE, Newbold CI, Ruebush TK 2nd, Danis M, Greenwood BM, Anderson RM, Olliaro P.
Averting a malaria disaster.
Lancet. 1999 Jun 5;353(9168):1965-7.

WHO/UNICEF (2005) World malaria report.
Verfügbar unter: <http://www.rbm.who.int/wmr2005/>.

Wood RJ, Cook LM, Hamilton A, Whitelaw A.
Transporting the marker gene *re* (red eye) into a laboratory cage population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), using meiotic drive at the MD locus.
J Med Entomol. 1977 Dec 24;14(4):461-4.

Wu M, Sun LV, Vamathevan J, Riegler M, Deboy R, Brownlie JC, McGraw EA, Martin W, Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Madupu R, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Durkin AS, Kolonay JF, Nelson WC, Mohamoud Y, Lee P, Berry K, Young MB, Utterback T, Weidman J, Nierman WC, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, O'Neill SL, Eisen JA.
Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements.

PLoS Biol. 2004 Mar;2(3):E69.

Xi Z, Khoo CC, Dobson SL.

Wolbachia establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population.

Science. 2005 Oct 14;310(5746):326-8.

Xi Z, Khoo CC, Dobson SL.

Interspecific transfer of Wolbachia into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*.

Proc Biol Sci. 2006 Jun 7;273(1592):1317-22.

Zamore PD.

RNA interference: big applause for silencing in Stockholm.

Cell. 2006 Dec 15;127(6):1083-6.

Zhong J, Karberg M, Lambowitz AM.

Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker.

Nucleic Acids Res. 2003 Mar 15;31(6):1656-64.

Lebenslauf

Tobias Löwe
geboren am 30.09.1979 in Radebeul
Würzburger Straße 20
97084 Würzburg
Telefon: 0931/67711
E-Mail: tobias.loewe@gmx.de

Berufliche Adresse:
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Universität Würzburg

Abteilung für Infektionskrankheiten
Josef-Schneider-Straße 2, Gebäude C6
97080 Würzburg

SCHULBILDUNG

1986-1990 Grundschule in Radebeul (Sachsen) und Neumarkt i.d.Opf. (Bayern)
1990-1997 Willibald-Gluck-Gymnasium Neumarkt
1997-1998 Colegio Atenas Ambato, Ecuador
1998-2000 Willibald-Gluck-Gymnasium Neumarkt (Abitur: 1,3)

AUSBILDUNG/UNIVERSITÄT:

2001-2007 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
Staatsexamen am 22.11.2007: Note „sehr gut“ (1,5)
Approbation am 10.12.2007

PUBLIKATIONEN/PATENTANMELDUNGEN:

Löwe et al., A refined genome engineering strategy against parasites and vectors: an application for malaria control, eingereicht bei Journal "Genome Biology".

Patentanmeldung U30010 DPMA

Patentanmeldung Referenznummer 10 2006 029 354.1

DERZEITIGE BESCHÄFTIGUNG:

Seit Februar 2008: Assistenzarzt in der Abteilung für Infektionskrankheiten, Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg

PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN IM RAHMEN DES STUDIUMS:

Famulaturen:

- Anästhesiologie im Zentrum für Operative Medizin der Universität Würzburg
- Radiologische und Nuklearmedizinische Gemeinschaftspraxis, Sanaklinik Nürnberg
- Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Berchtesgaden und im Klinikum der Universität Würzburg
- Allgemeinarztpraxis in Neumarkt

Praktisches Jahr:

- Innere Medizin
- Chirurgie und
- Dermatologie, jeweils im Klinikum der Universität Würzburg

Fremdsprachen

- Englisch
- Spanisch
- Latein

FAMILIÄRES:

Eltern: Dr. med. Hans-Jürgen Löwe; Dr. med. Barbara Löwe

Geschwister: Marcus, 24 Jahre; Alexander, 29 Jahre

Familienstand: verheiratet mit Verena Löwe

Konfession: evangelisch

Kinder: Leander Maximilian Löwe, geboren am 13.01.2004;
Demian Paul Löwe, geboren am 08.10.2006

Würzburg, den

Tobias Löwe