

**Die Expression  
der Multiadhäsionsdomänenproteine  
*PfCCp5* und *PfFNPA*  
in *Plasmodium falciparum*  
und  
Cysteinprotease-Inhibitoren als potentielle  
Wirkstoffe gegen Malaria**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Marie-Adrienne Dude**

geboren in Dresden

**Filderstadt 2009**

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: PD Dr. phil. nat. Gabriele Pradel

2. Gutachter: PD Dr. med. August Stich

Tag des Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: PD Dr. phil. nat. Gabriele Pradel

2. Prüfer: PD Dr. med. August Stich

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation

**„Die Expression der Multiadhäsionsdomänenproteine *PfCCp5* und *PfFNPA* in *Plasmodium falciparum* und Cysteinprotease-Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe gegen Malaria“**

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

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

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

Filderstadt, im September 2009

-----

Marie-Adrienne Dude

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit von Februar 2005 bis Juli 2008 beigetragen haben:

**Frau PD Dr. phil. nat. G. Pradel**, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in einem spannenden und herausfordernden Forschungsgebiet anzufertigen sowie meinen Wissenshorizont durch fachübergreifende Kollaborationen und der Teilnahme an einer Vielzahl von Tagungen erweitern zu können.

**Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker**, Institut für molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Möglichkeit, an seinem Institut promovieren zu können.

**Herrn PD Dr. med. A. Stich**, Missionsärztliche Klinik, Würzburg, für die Übernahme des Zweitgutachtens, seine Bereitschaft, Mitglied meiner Prüfungskommission zu sein und der Möglichkeit, sowohl durch die Teilnahme an einem Malariadiagnostikkurs als auch durch Einblicke in den Alltag eines Tropenmediziners die klinische Seite der Malaria näher kennen lernen zu dürfen.

**Frau Prof. Dr. rer. nat. T. Schirmeister**, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, für die Bereitstellung der Etacrynsäure-derivate, die Möglichkeit an einem so interessanten pharmazeutischen Thema mitarbeiten zu können, die großartige Kollaboration und ihre stets offenes Ohr für meine „chemischen“ Probleme.

**Herrn Dr. rer. nat. R. Vičik**, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, für seine beständige Hilfsbereitschaft, mir in zahlreichen Nachhilfestunden die Chemie der Peptidomimetika verständlicher zu machen.

**Frau Dr. rer. nat. R. Ettari**, Dipartimento Farmaco-Chimico, Università di Messina, Italien, für die Bereitstellung der peptidomimetischen Cysteinprotease-Inhibitoren.

**Frau Prof. Dr. rer. nat. A. Ponte-Sucre**, Instituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, für die Einführung in die Wirkstoffforschung und Pharmakologie, ihre vielen hilfreichen Tipps zu Bewertung meiner Screening-Daten sowie ihre außerordentliche Kollegialität.

**Frau Prof. Dr rer. nat. H. Moll** und ihrer Arbeitsgruppe, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, für die vielen anregenden, fachlichen Diskussionen in unserem gemeinsamen „Donnerstagsseminar“.

**Frau Dr. vet. Dr. rer. nat. K. Remer**, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, für ihre Freundschaft, ihr stets offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte und viele gemeinsame Stunden in „einer anderen Zeit“.

**Herrn Dr. med. T. Schwarz**, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, für seine überaus „feinfühligem“ Blutabnahmen zur Kultivierung meiner transfizierten Parasiten.

**Frau Dipl. Biol. A. Kühn und Frau Dipl. Biol. I. Rupp**, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, für die Spende ihres Blutes zur Aufzucht meiner transfizierten Parasiten.

**Herrn Dipl. Biol. R. Frank**, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, für die Kultivierung und Präparation der *P.-falciparum*-Mückenstadien während seiner Diplomarbeit am Imperial College in London und die Unterstützung bei der Erstellung der Affinitätschromatographiestudien während seiner Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Zentrum für Infektionsforschung.

**Frau Dipl. Biol. N. Simon** für die gute Zusammenarbeit bei der Erstellung der Interaktiosstudien.

**Frau L. Sologub**, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, für die Übernahme der Erythrozytenaufreinigung, der Serumfiltration und Medienpräparation für die *P.-falciparum*-Kultivierung in unserer Arbeitsgruppe und die tollen, gemeinsamen Stunden an der „Bench“.

**Herrn Prof. Dr. rer. nat. G. Krohne, Frau D. Bunsen, Frau C. Gehrig und Frau E. Meyer-Natus**, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg, für ihre allzeit große Hilfsbereitschaft bei der Erstellung sowohl von Ultradünnschnitten als auch von elektronenmikroskopischen Aufnahmen meiner Einbettungen.

**Frau Ph. D. C. Moreira und Prof. Ph. D. T. Templeton**, Weill Medical College, New York, USA, für den zur Verfügung gestellten PfCCp1-KO-Stamm und die Transfektion der pDT-Tg23-KO-Konstrukte sowie die stets freundschaftliche Kommunikation über zwei Kontinente hinweg.

**Frau Dr. rer. nat. A.-K. Müller**, Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg, für die vielen anregenden Diskussionen zur Herstellung und Analyse von *P.-falciparum*-KO-Parasiten und ihre stets offene Tür.

**Herrn Dr. B. Weissbrich und seinem Team**, Lehrstuhl für Virologie, Universität Würzburg, für die jederzeit schnelle und verlässliche Sequenzierung meiner Klonierungsprodukte.

**Frau Dr. rer. nat. C. Wagner, Frau Dipl. Biol. N. Simon, Frau L. Sologub und Frau S. Weiss** für die Übernahme der Tierversuche.

**Frau B. Plaschke** für die Bereitstellung des Sequenziermixes und viele nützliche Labor- und Alltagstipps.

**Frau Dr. rer. nat. A.-K. Müller, Frau Dipl. Biol. A. Kühn, Frau Dipl. Biol. R. Bosse und Herrn Dipl. Biol. R. Frank** für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen hier nicht namentlich erwähnten **Mitarbeitern des IMIB/ZINF** der Universität Würzburg für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und die harmonische Zusammenarbeit.

Dem **Emmy Noether-Programm** (DFG) und dem **Sonderforschungsbereich 630** (SFB 630) für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit.

**Meiner Mutter, meinen Großeltern und meinem Schatz** für ihre immer währende Unterstützung und ihren unerschütterlichen Glauben an mich.

**Herrn Dr. Ing. F. Stadler** für seine Hilfe bei Computerproblemen und seine moralische Unterstützung in den Krisenzeiten meiner Promotion.

**Meinen ehemaligen Nachbarn, Frau M. Kuhn, Frau C. Ferstl, Herrn E. Rombach, Herrn T. Müller und Herrn A. Romeis** für „ein Leben nach dem Labor“ und das Gefühl, in Würzburg zu Hause zu sein.

***Ehrfurcht vor dem Leben ist die höchste Instanz.  
Was sie gebietet, hat seine Bedeutung auch dann,  
wenn es töricht oder vergeblich scheint.***

Albert Schweitzer

(1875-1965)

deutsch-französischer Arzt und Friedensnobelpreisträger

**Für meine Familie.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie der Tropenkrankheit Malaria.....	1
1.1.1	Verbreitung und Geschichte.....	1
1.1.2	Krankheitsbild .....	2
1.2	Der Malariaerreger <i>Plasmodium falciparum</i> .....	3
1.2.1	Taxonomie und Morphologie.....	3
1.2.2	Lebenszyklus.....	5
1.3	Impfstoffforschung.....	10
1.3.1	Immunevasions- und Immunsuppressionsmechanismen von <i>P. falciparum</i> .....	10
1.3.2	Präerythrozytäre Vakzine.....	11
1.3.3	Erythrozytäre Vakzine .....	12
1.3.4	Transmissionsblockierende Vakzine .....	13
1.4	Die PfCCp-Proteinfamilie .....	16
1.4.1	Identifizierung und Aufbau .....	16
1.4.2	Expressions- und Funktionsanalyse der PfCCp-Proteine .....	19
1.5	Wirkstoffforschung .....	21
1.5.1	Klassische Malariamedikamente und Resistenzmechanismen .....	21
1.5.2	Die plasmodialen Cysteinproteasen Falcipain-2 und Falcipain-3 .....	24
1.5.3	Cysteinprotease-Inhibitoren .....	26
1.6	Ziel der Arbeit .....	29
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
2.1	Material.....	31
2.1.1	Technische Geräte und Anlagen .....	31
2.1.2	Einwegmaterialien .....	34
2.1.3	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Versuchstiere .....	35
2.1.4	Laborkits und Enzyme .....	36
2.1.5	Puffer und Lösungen .....	36
2.1.6	Medien und Agarplatten.....	40
2.1.7	Zelllinien und Bakterienstämme.....	42
2.1.8	Plasmide .....	43
2.1.9	Oligonukleotide .....	45
2.1.10	DNA-Längen- und Proteinmassenstandards.....	48
2.1.11	Antikörper .....	48
2.1.12	PlasmoDB-Identifizierungsnummern .....	50

2.1.13	<b>Getestete Inhibitoren</b> .....	51
2.1.14	<b>Angewandte Computerprogramme</b> .....	53
2.2	<b>Methoden</b> .....	<b>54</b>
2.2.1	<b>Mikrobiologische und zellbiologische Methoden</b> .....	54
2.2.1.1	Kultivierung von Bakterienstämmen .....	54
2.2.1.2	Transformation kompetenter Bakterienstämme .....	54
2.2.1.3	Konservierung von transformierten Bakterien.....	55
2.2.1.4	Kultivierung, Synchronisierung und Konservierung von <i>P.-falciparum</i> -Blutstadien .....	55
2.2.1.5	Bestimmung der Parasitämie mittels Giemsa-Färbung .....	59
2.2.1.6	Exflagellationstests.....	60
2.2.1.7	Aufreinigung von <i>P.-falciparum</i> -Blutstadien .....	60
2.2.1.8	Transfektion von <i>P.-falciparum</i> -Blutstadien .....	63
2.2.1.9	Immunfluoreszenzstudien.....	68
2.2.1.10	Transmissionselektronenmikroskopische Studien .....	70
2.2.2	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	73
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	73
2.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion .....	74
2.2.2.3	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	77
2.2.2.4	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen .....	77
2.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	79
2.2.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen .....	80
2.2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	80
2.2.2.8	Replikation und Isolation von Plasmid-DNA.....	81
2.2.2.9	DNA-Sequenzierung .....	82
2.2.2.10	RNA-Isolation und cDNA-Synthese .....	83
2.2.2.11	Isolation genomischer DNA aus <i>P. falciparum</i> .....	85
2.2.3	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	86
2.2.3.1	Expression rekombinanter Proteine.....	86
2.2.3.2	Aufreinigung rekombinanter Proteine .....	87
2.2.3.3	Herstellung von Antikörpern .....	89
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-Gelfärbung sowie -Konservierung und Bestimmung der Proteinkonzentration .....	90
2.2.3.5	Western-Blot-Analyse.....	91
2.2.3.6	Interaktionsstudien mittels Ko-Immunpräzipitationen .....	93
2.2.3.7	Interaktionsstudien mittels Affinitätschromatographien .....	94
2.2.3.8	Viabilitätstest an asexuellen <i>P.-falciparum</i> -Blutstadien .....	96
3	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>100</b>
3.1	<b>Charakterisierung von PfCCp5 und PfFNPA im Lebenszyklus von P. falciparum</b> .....	<b>100</b>
3.1.1	<b>Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter PfCCp5- und PfFNPA-Proteine</b> .....	100
3.1.1.1	Expression rekombinanter PfCCp5- und PfFNPA-Proteine .....	101
3.1.1.2	Test der Immunseren an rekombinanten Proteinen und an <i>P.-falciparum</i> -NF54-Gametozytenlysat.....	104
3.1.2	<b>Expressionsanalysen der PfCCp5- und PfFNPA-Proteine</b> .....	106
3.1.2.1	Analyse der Expression von PfCCp5 und PfFNPA auf RNA-Ebene.....	106
3.1.2.2	Stadienspezifische Expressionsstudien von PfCCp5 und PfFNPA auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen.....	107

3.1.2.3	Stadienspezifische Expressionsstudien von <i>PfCCp5</i> und <i>PfFNPA</i> auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzstudien.....	109
3.1.2.4	Ultrastrukturelle Lokalisation von <i>PfCCp5</i> und <i>PfFNPA</i> .....	115
<b>3.1.3</b>	<b>Herstellung von <i>PfCCp5</i>- bzw. <i>PfFNPA</i>-KO- sowie von Komplementations-Parasiten .....</b>	<b>116</b>
3.1.3.1	Verifizierung von <i>PfCCp5</i> - und <i>PfFNPA</i> -KO-Parasiten .....	116
3.1.3.2	Verifizierung von <i>PfCCp5</i> - und <i>PfFNPA</i> -Komplementations-Parasiten .....	119
<b>3.2</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung von <i>PfCCp5</i> und <i>PfFNPA</i> mittels Interaktionsstudien .....</b>	<b>120</b>
3.2.1	Ko-abhängige Expression der <i>PfCCp5</i> - und <i>PfFNPA</i> -Proteine .....	120
3.2.2	Ko-Immunpräzipitationsstudien .....	124
3.2.3	Affinitätschromatographiestudien .....	126
<b>3.3</b>	<b>Test der Inhibitoren auf antiplasmodiale Aktivität .....</b>	<b>132</b>
3.3.1	Validierung der Testbedingungen mit Chloroquin .....	132
3.3.2	Einfluss der Peptidomimetika auf <i>P.-falciparum</i> -Blutstadien.....	134
3.3.3	Einfluss der Etacrynsäurederivate auf <i>P.-falciparum</i> -Blutstadien ..	135
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>137</b>
4.1	Expression und Funktion von <i>PfCCp5</i> und <i>PfFNPA</i> im Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> .....	137
4.2	Molekulare Wechselwirkungen der <i>PfCCp</i> -Proteine während der Sexualphase von <i>P. falciparum</i> .....	147
4.3	Die Rolle der <i>PfCCp</i> -Proteine während der Fertilisationsprozesse von <i>P. falciparum</i> – eine Arbeitshypothese.....	157
4.4	Das Potential der <i>PfCCp</i> -Proteine als Komponenten für die Entwicklung von TBV zur Bekämpfung der Malaria.....	162
4.5	Einfluss der 1,4-Benzodiazepin- sowie der Etacrynsäurederivate auf asexuelle <i>P.-falciparum</i> -Blutstadien .....	165
<b>5</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>177</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>180</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>182</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>184</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>209</b>
§	Abkürzungen und Einheiten .....	209
§	Abbildungsverzeichnis.....	214
§	Tabellenverzeichnis.....	218
§	Gensequenz von <i>PfCCp5</i> und Lokalisation der Primer .....	219
§	Gensequenz von <i>PfFNPA</i> und Lokalisation der Primer .....	221
§	Einzelwerte der Viabilitätstests .....	223
§	Curriculum Vitae.....	224
§	Publikationen und Konferenzbeiträge.....	227

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie der Tropenkrankheit Malaria

### 1.1.1 Verbreitung und Geschichte

Weltweit zählt Malaria, neben Tuberkulose und HIV, zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten. Die jährliche Zahl der klinischen Fälle wird auf ca. 250 Millionen geschätzt und es sterben pro Jahr eine Millionen Menschen an den Folgen einer Malariainfektion (WHO, 2008). Bereits in den Jahren zwischen 1955 und 1970 koordinierte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) das *Global-Eradication-of-Malaria-Program*, an dem sich weltweit etwa 50 Staaten beteiligten. Durch großflächiges Ausbringen des Insektizids Dichlordiphenyltrichlorethan (DTT) sollte damals die Zahl der Neuinfektionen drastisch gesenkt werden. Jedoch entwickelten die *Anopheles*-Mücken rasch Resistenzen gegen DTT und die Malaria begann sich nachhaltig wieder auszubreiten. Darüber hinaus traten zunehmend Erregerstämme auf, welche gegen das preiswerte und vielfach eingesetzte Antimalariamittel Chloroquin Resistenzen aufwiesen, wodurch dieses Therapeutikum gegenwärtig nur noch sehr beschränkt eingesetzt werden kann (Übersichtsartikel Schlitzer, 2007). Heute steht Malaria an erster Stelle unter den Tropenkrankheiten (Snow *et al.*, 2005). Malaria tritt in insgesamt 109 Ländern, v. a. der Tropen und Subtropen, auf (WHO, 2008). Die meisten Erkrankungen werden hierbei durch den Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), verursacht und 90% aller Infektionen werden auf dem afrikanischen Kontinent südlich der Sahara verzeichnet (Abb. 1.1). Die größte Gefahr besteht für Schwangere bzw. Kinder, welche das fünfte Lebensjahr noch nicht vollendet haben, da ihr Immunsystem noch nicht vollständig ausgebildet ist (Menendez *et al.*, 2000; Steketee *et al.*, 2001; Saute *et al.*, 2002). Trotz neuer Therapieansätze, Prophylaktika und intensiver Aufklärungskampagnen wird das Ziel, bis zum Jahre 2015 die Infektionsrate zu halbieren, ohne eine Erhöhung der Finanzmittel sowie eine weltweit effektivere Kontrolle der Malaria, wahrscheinlich nicht erreicht werden (Snow *et al.*, 2008). Malaria stellt ein massives wirtschaftliches Problem aufgrund des enormen Arbeitskraftverlustes für die betroffenen Länder dar (Sachs und Maleny, 2002; Greenwood und Mutabingwa, 2002).

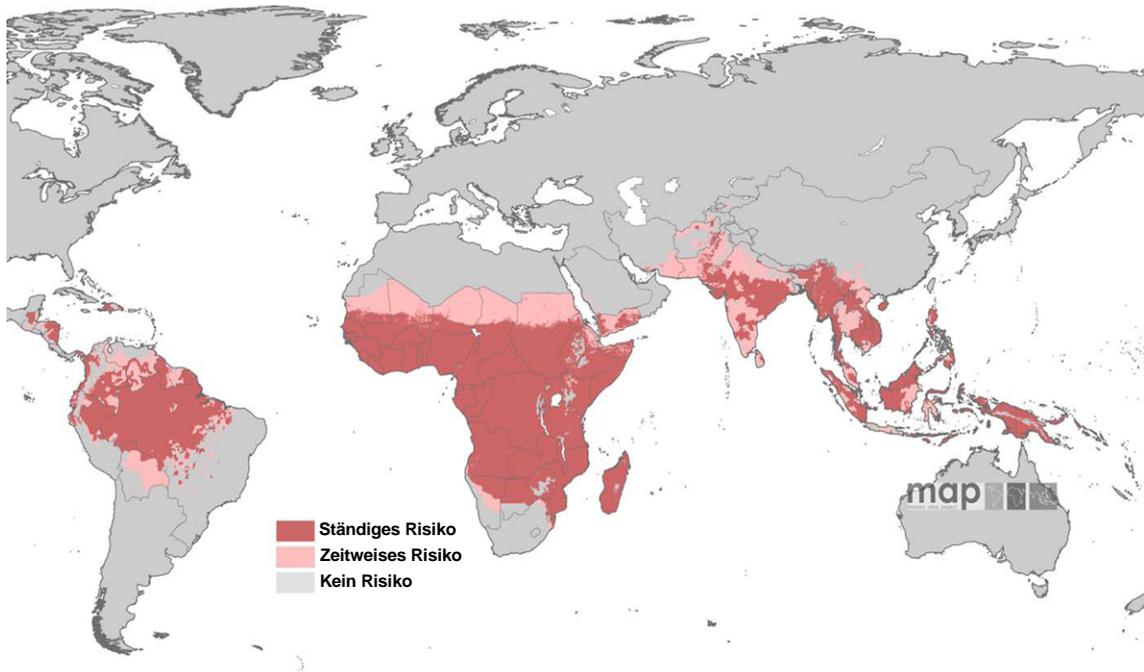


Abb. 1.1. Geographische Verbreitung der durch *P. falciparum* verursachten Malaria tropica. Die dunkelrosa eingefärbten Areale geben Gebiete mit ständigem Infektionsrisiko an, die hellrosa gefärbten Areale kennzeichnen Gebiete mit zeitweisem Infektionsrisiko. In den grau gefärbten Arealen besteht hingegen ganzjährig keine Infektionsgefahr. Quelle: <http://www.map.ox.ac.uk>, verändert.

Zunehmend schnellere Resistenzbildungen der Erreger gegen neu auf den Markt eingeführte, preiswerte Kombinationspräparate sowie eine Ausbreitung der Malaria in bisher nicht betroffene Gebiete aufgrund der globalen Erwärmung verdeutlichen die Dringlichkeit der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze und der Identifizierung möglicher Impfstoffkandidaten (Schlitzer, 2008; Stratton *et al.*, 2008).

### 1.1.2 Krankheitsbild

Malaria wird durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* ausgelöst. Insgesamt sind vier humanpathogene *Plasmodien*-Arten bekannt. *P. vivax* und *P. ovale* sind die Erreger der Malaria tertiana, *P. malariae* verursacht die Malaria quartana und *P. falciparum* die Malaria tropica. Während *P. vivax* v. a. in Asien und Lateinamerika sowie in wenigen Teilen Afrikas verbreitet ist, tritt eine Infektion mit *P. malariae* meist in einigen Regionen Indiens sowie in Ost- und Westafrika auf. *P. ovale* findet sich dagegen lediglich in Westafrika und auf einigen pazifischen Inseln. Infektionen mit beiden letztgenannten Malariaerregern treten jedoch nur sehr selten auf. Die Erreger der Nagermalaria *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. knowlesi* und *P. yoelii* spielen eine wichtige Rolle als Modellorganismen für die Erforschung der Malaria.

Die Krankheitsbilder der drei Malariaformen unterscheiden sich hinsichtlich der Periodizität der Fieberschübe und der Schwere der Erkrankung (Lucius und Loos-Frank, 2008). Während sich bei der Malaria tertiana die Fieberschübe alle zwei Tage wiederholen und einen vierstündigen Rhythmus haben, treten die Fieberattacken bei der Malaria quartana alle 72 Stunden auf und dauern vier bis fünf Stunden an. Bei der Malaria tropica handelt es sich um die schwerste Krankheitsform mit einer Inkubationszeit von zwölf Tagen. Da die Blutstadien von *P. falciparum* asynchron reifen und demzufolge die Fieberschübe unregelmäßig verlaufen, treten oftmals schwere Komplikationen, wie Schock, Kreislauf- und Nierenversagen oder Lungenödeme auf. Der massive Befall der Erythrozyten führt darüber hinaus v. a. bei Kleinkindern oft zur Anämie. *P. falciparum* kann, im Gegensatz zu den übrigen Malariaerregern, alle Entwicklungsstadien der Erythrozyten befallen und häufig finden Mehrfachbefälle statt. Die massive Hämolyse führt des Weiteren häufig zur Hämoglobinurie und zum Nierenversagen. Die besondere Gefährlichkeit der Malaria tropica ist bedingt durch die Adhärenz der befallenen roten Blutzellen an den Endothelien der Kapillaren von viszeralen Organen wie Gehirn, Herz, Lunge und Nieren. Bei Schwangeren ist die Plazenta besonders betroffen, wodurch oft Fehlgeburten auftreten. Die Zytoadhärenz führt zu einer Verstopfung der Kapillaren und damit zur Störung der Mikrozirkulation sowie der Sauerstoffversorgung in den Organen, was Ödembildungen zur Folge hat. Hervorgerufen wird diese Zytoadhärenz durch die Ausbildung so genannter *knobs* auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten. Der Parasit exprimiert hierfür ein Protein, PfEMP1, das in die Erythrozytenmembran inseriert und an Liganden der Oberfläche von Endothelzellen bindet (Übersichtsartikel Cooke *et al.*, 2004). Die Anheftung infizierter roter Blutkörperchen an die Gefäßendothelien ermöglicht dem Parasiten gleichzeitig die Immunevasion durch Verhinderung einer Aussortierung befallener Zellen in der Milz (Chotivanich *et al.*, 2000, 2002). Die schwerste Verlaufsform der Malaria tropica ist die zerebrale Malaria, bei der es durch Ausfall der Gehirnfunktionen zu Koordinationsstörungen, Verwirrtheit, Lähmungen, Koma und schließlich Tod kommen kann.

## **1.2 Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum***

### **1.2.1 Taxonomie und Morphologie**

*P. falciparum* ist ein einzelliger Eukaryont (Protozoa), welcher zum Stamm der Alveolata gezählt wird.

Nach Luzius und Loos-Frank (2008) wird dieser obligate Endoparasit wie folgt taxonomisch eingeordnet:

Reich: Animalia

Unterreich: Protozoa

Stamm: Alveolata

Unterstamm: Apicomplexa

Klasse: Haemotozoea

Ordnung: Haemosporida

Familie: Plasmodiidae

Gattung: *Plasmodium*

Art: *P. falciparum*

Dem Stamm der Alveolata gemeinsam ist der Besitz einer dreischichtigen Zellhülle (Pellicula), welche sich aus der außen liegenden Plasmamembran sowie aus zwei inneren, eng aneinander liegenden Membranen zusammensetzt. Diese umschließen den so genannten pelliculären Zwischenraum. Unterhalb der Zelloberfläche verlaufende subpelliculäre Mikrotubuli geben dem Parasiten seine feste Gestalt (Abb. 1.2) und münden in dem zirkulären, apikalen Polring. Namens gebend für den Unterstamm der Apicomplexa ist der am anterioren Pol gelegene Apikalkomplex, welcher sich aus einer Vielzahl von sekretorischer Organellen zusammensetzt. Den subpelliculären Mikrotubuli und dem Apikalpomplex wird eine aktive Rolle an Bewegungsvorgängen sowie beim Eindringen der invasiven Parasitenstadien in ihre entsprechende Wirtszelle zugesprochen (Russell und Sinden, 1981; Keeley und Soldati, 2004; Cowman und Crabb, 2006).

Das erythrozytäre Invasionsstadium von *Plasmodium* ist der Merozoit, dessen Apikalkomplex aus zwei keulenförmigen Rhoptrien, den länglichen Mikronemen, den polaren Ringen und elektronendichten Granula besteht (Abb. 1.2). Während des Eindringens in den Erythrozyten werden die Inhaltsstoffe (v. a. Proteine) der Mikronemen, welche für die Adhäsion an die Wirtszelle, und der Rhoptrien, welche für die Invasion verantwortlich sind, freigesetzt (Preiser *et al.*, 2000; Cowman und Crabb, 2006). Die Dichten Granula geben nach erfolgter Invasion der Wirtszelle mittels Exozytose ihre Inhaltsstoffe ab (Culvenor *et al.*, 1991).

Wie nahezu alle Apicomplexa besitzt *P. falciparum* ein durch sekundäre Endosymbiose einer Grün- oder Rotalge erworbenes Zellorganell, den Apikoplast (Köhler *et al.*, 1997; Waller *et al.*, 2003). Der Apikoplast ist an das Mitochondrium gebunden, besitzt ein

eigenes Genom von 35 kb (Kobayashi *et al.*, 2007) und ist Angriffspunkt für neue Therapeutika zur Behandlung von Malaria (Goodmann und McFadden, 2007; Wiesner und Joomaa, 2007; Dahl und Rosenthal, 2008). Die intraerythrozytären Stadien des Parasiten sind ferner von einer parasitophoren Vakuole umgeben und mittels eines Zytostoms erfolgt die endozytotische Nahrungsaufnahme. Das durch Abbau von Hämoglobin entstandene, für den Parasiten toxische Häm wird in Form des atoxischen, bräunlich-kristallinen Hämozoins in Pigmentvakuolen abgelagert (Slater *et al.*, 1991; Bohle *et al.*, 1997). Dieses Polymerisationsprodukt wird auch als Malariapigment bezeichnet und ist lichtmikroskopisch sichtbar. *P. falciparum* besitzt ein haploides Genom von 22,8 Megabasen bestehend aus 14 Chromosomen. Mit der Kernhülle assoziiert ist das Endoplasmatisches Retikulum (ER) und einen rudimentärer Golgi-Apparat.

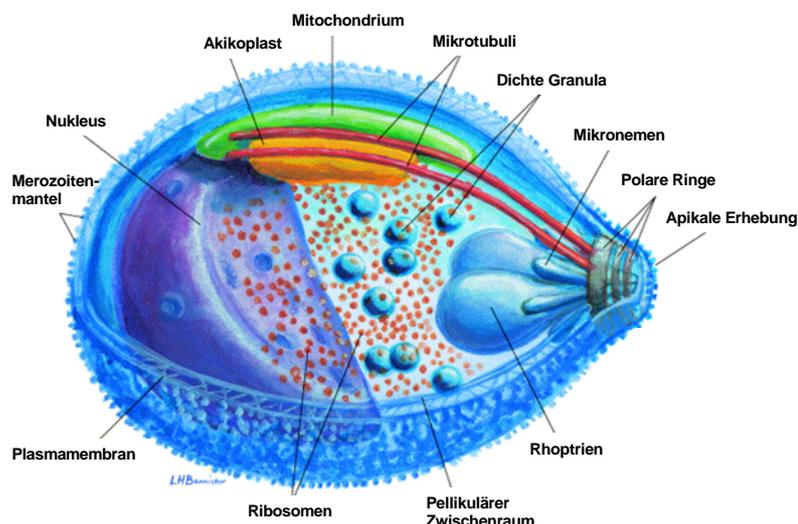


Abb. 1.2 Schematische Darstellung eines Merozoiten von *P. falciparum*.  
Quelle: Bannister *et al.*, 2000, verändert.

### 1.2.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *P. falciparum* ist durch einen dreiphasigen Generationswechsel von geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Vermehrung (Schizogonie, Gamogonie und Sporogonie) gekennzeichnet. Hierbei findet ein obligatorischer Wirtswechsel zwischen dem Menschen als Zwischenwirt und der *Anopheles*-Mücke als Endwirt statt. Der Entwicklungszyklus von *P. falciparum* (Abb. 1.3) beginnt mit dem Stich einer infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke. Während der Blutmahlzeit werden 15 bis 20 Sporozoiten aus den Speicheldrüsen der Mücke in die Blutkapillare des Menschen injiziert (Rosenberg *et al.*, 1990). Über die Blutbahn gelangen die Sporozoiten binnen weniger Minuten zur Leber und dringen dort in Leberparenchymzellen (Hepatozyten)

ein. Hier findet die exoerythrozytäre Schizogonie statt. Der Sporozoit reift dabei zu einem Leberschizonten heran, aus welchem ca. 30.000 Merozoiten hervorgehen.

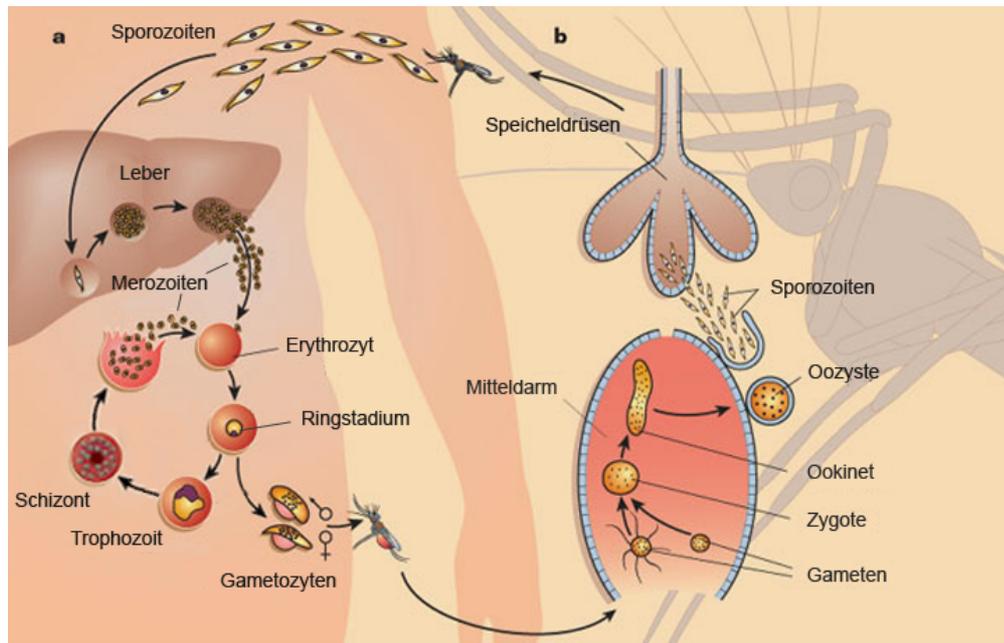


Abb. 1.3. Schematische Darstellung der Entwicklung von *Plasmodium falciparum* im menschlichen Zwischenwirt (a) und im Mücken-Endwirt (b). Quelle: Cowman und Crabb, 2006, verändert.

Nach etwa 72 Stunden platzt die infizierte Leberzelle und die Merozoiten werden in die Lebersinusoiden entlassen (Sturm und Heussler, 2007). Die Merozoiten sind hierbei von einem Membransäckchen umgeben, welches als Merosom bezeichnet wird und von der abgestorbenen Leberparenchymwirtszelle stammt. Durch die Merosomen sind die Parasiten vor dem Angriff des humanen Immunsystems geschützt und gelangen so ungehindert über die Lebersinusoiden zurück in die Blutbahn. Dort invadieren die Merozoiten aktiv die Erythrozyten. Innerhalb der befallenen roten Blutkörperchen entstehen zunächst so genannte Ringstadien, welche durch Umbau der Plasmamembran und der Erythrozytenmembran Stoffaustausch mit der Wirtszelle betreiben können. Die erythrozytären Stadien von *P. falciparum* ernähren sich vom Hämoglobin ihrer Wirtszelle, welches als Aminosäurequelle dient. Hierzu wird das Hämoglobin in eine eigens gebildete Nahrungsvakuole aufgenommen und verdaut. Ein Abfallprodukt dieses Verdauens des roten Blutfarbstoffes ist das toxische Häm, das zu atoischem Hämozoin polymerisiert wird.

Die Entwicklung zum reifen Trophozoiten beginnt achtzehn bis vierundzwanzig Stunden nach der Invasion der Erythrozyten und ist durch vermehrte mRNA- und Proteinsynthese gekennzeichnet. Die erythrozytäre Schizogonie wird sechsunddreißig Stunden nach erfolgter Invadierung durch Kernteilung und Fusion der Nahrungs-

vakuolen zur Residualvakuole eingeleitet. Die befallenen Erythrozyten platzen nach etwa achtundvierzig Stunden und aus dem reifen Schizonten werden acht bis zwölf Merozoiten freigesetzt. In Folge der Ruptur der Residualvakuole gelangen in Restkörpern enthaltenes Hämozoin sowie Phospholipide und Proteine in den Blutstrom. Diese regen eine inflammatorische Reaktion durch die Ausschüttung von Zytokinen an, wodurch die charakteristischen Fieberattacken entstehen. Die freigesetzten Merozoiten können erneut Erythrozyten befallen und damit einen weiteren Zyklus erythrozytärer Schizogonie einleiten. Ein Teil der Merozoiten differenziert sich jedoch Tage bis Wochen nach Beginn der erythrozytären Schizogonie zu Sexualstadien. Die Entwicklung eines sexuell determinierten Merozoiten zu einem reifen Gametozyten wird als Gamogonie bezeichnet und dauert ca. fünfzehn Tage. Die Determinierung zur asexuellen oder sexuellen Entwicklung findet bereits im Schizonten statt (Bruce *et al.*, 1990) und aus einem einzelnen sexuell determinierten Schizonten gehen aus allen Tochtermerozoiten entweder nur weibliche oder nur männliche Gametozyten hervor (Silvestrini *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Die Reifung der Gametozyten wird in fünf morphologisch unterscheidbare Stadien eingeteilt (siehe Übersichtsartikel Talman *et al.*, 2004), welche in Abb. 1.4 dargestellt sind.

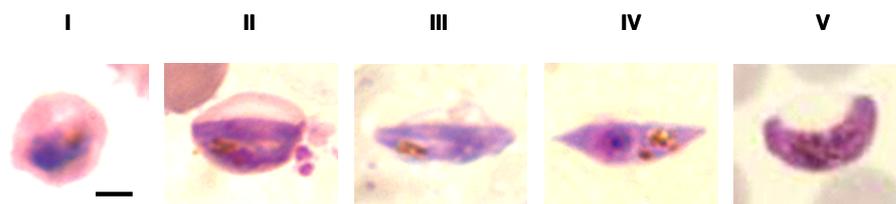


Abb. 1.4. Die fünf Stadien der *P.-falciparum*-Gametozyten. I bis III: der reife Trophozoit beginnt sich zu strecken; Stadium IV: der Gametozyt ist lang und spindelförmig; Stadium V: die Zellpole des Gametozyten runden sich ab und er nimmt eine halbmondförmige Gestalt an. Größenangabe, 2 µm.

Die Gametozyten des Stadium I sind morphologisch noch nicht von asexuellen Trophozoiten unterscheidbar. Ab dem späten Stadium II entwickeln die Gametozyten dann eine gebogene, halbmondförmige Gestalt, der *P. falciparum* (lat. *falcis* = die Sichel; *parere* = gebären) seinen Namen verdankt. Durch die Streckung der Mikrotubuli und unter Einbeziehung der subpellikulären Membran bildet sich ein pellikulärer Komplex aus, der in Stadium V in Folge von Depolymerisation wieder abgebaut wird (Sinden, 1982). In Gametozyten des Stadiums I bis III findet zudem eine vermehrte Synthese von mRNA sowie von Ribosomen und ER statt. Ab dem Stadium III treten des Weiteren membranbegrenzte, elektronendichte Organellen, die osmiophilen Körperchen, unterhalb der Parasitenoberfläche auf (Abb. 1.5), welche überwiegend in

weiblichen Makrogametozyten vorhanden sind. Die osmiophilen Körperchen sind vermutlich am Ausbrechen der Gametozyten aus den Erythrozyten beteiligt, denn sie geben ihre Inhalte innerhalb von Minuten nach der Gametozytenaktivierung in die parasitophore Vakuole ab (Sinden *et al.*, 1978; Alano *et al.*, 1995, Hayton *et al.*, 2008).

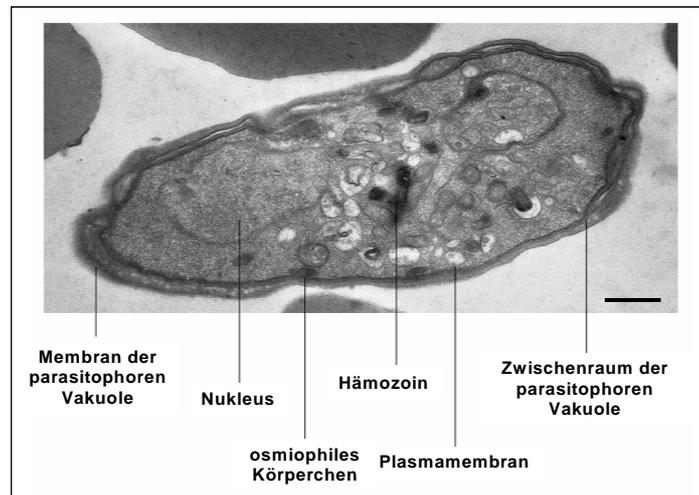


Abb. 1.5. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines *P. falciparum*-Gametozyten. Größenangabe, 1 µm. Ultrastrukturell sind neben dem Nukleus und des abgelagerten Hämozoïns die osmiophilen Körperchen, dicht unterhalb der Plasmamembran, erkennbar. Quelle: PD Dr. phil. nat. G. Pradel, verändert.

Etwa neun bis zwölf Tage nach Beginn der Gametozytogenese entwickelt sich das Stadium V. In diesem Stadium sind die morphologischen Unterschiede beider Geschlechter lichtmikroskopisch anhand von Giemsa-Färbung deutlich sichtbar. Die basophilen Makrogametozyten erscheinen nun bläulich und die Mikrogametozyten weisen eine rötliche Färbung auf. Ultrastrukturell unterscheiden sich Makrogametozyten durch verdichtete Hämozoïnablagerungen und ein ausgedehntes ER von den männlichen Mikrogametozyten. Das Verhältnis männlicher Mikrogametozyten zu weiblichen Makrogametozyten beträgt etwa 1:5. Da sich jedoch aus einem Mikrogametozyten acht Mikrogameten entwickeln, ist das Geschlechterverhältnis nach der Bildung von Gameten wieder ausgeglichen (Übersichtsartikel Talman *et al.*, 2004; Pradel, 2007). Während sich die Gametozyten des Stadium I bis IV an Wirtszellen wie bspw. Knochenmarkszellen anheften, um dem Aussortieren in der Milz zu entgehen, finden sich die Gametozyten des Stadium V überwiegend frei in den peripheren Blutgefäßen (Smalley *et al.*, 1981; Rogers *et al.*, 2000). Dort werden diese von einer weiblichen *Anopheles*-Mücke bei ihrer Blutmahlzeit aufgenommen und gelangen in deren Mitteldarm. Innerhalb von nur 15 Sekunden wird sodann die Gametogenese eingeleitet (Billker *et al.*, 1998). Verantwortlich sind hierfür *in vivo* ein Temperaturabfall um mindestens 5°C (Billker *et al.*, 1997) sowie die Anwesenheit von Xanthurensäure

im Mückendarm (Billker *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1998), einem Nebenprodukt der Ommochromsynthese bei Insekten (Beard *et al.*, 1995). Darüber hinaus wird ein bisher nicht identifizierter Faktor im humanen Serum als weiteres induzierendes Signal diskutiert (Arai *et al.*, 2001). *In vitro* kann durch Erhöhung des pH-Werts auf acht die Gametogenese auch künstlich ausgelöst werden (Billker *et al.*, 1997).

Infolge der Aktivierung der Gametozyten durch den Einfluß der oben beschriebenen Faktoren wird die Gametogenese eingeleitet. Hierbei brechen die Gametozyten zunächst aus dem Erythrozyten aus und entwickeln sich dann im Mitteldarmlumen binnen zehn Minuten zu Gameten. Dies geht, insbesondere bei den männlichen Gametozyten, mit einem äußerlichen Gestaltwechsel einher, der als Exflagellation bezeichnet wird. Während der falcipare Makrogametozyt sich zum sphärischen Makrogameten abrundet und anschließend für die Fertilisation bereit ist, durchläuft der Mikrogametozyt zunächst drei Replikationsrunden verbunden mit endomitotischen Teilungen (Janse *et al.*, 1988). Der nun oktoploide Mikrogametozyt bildet darauf acht flagellenartige Mikrogameten aus. Diese vollführen heftig schlagende Bewegungen und adhären an infizierte und uninfizierte Erythrozyten sowie an Makrogameten und Gametozyten in ihrer Umgebung. Vermutlich spielen Glycophorin A und Sialinsäure bei der Anheftung der Mikrogameten an Erythrozyten eine maßgebliche Rolle (Templeton *et al.*, 1998). Dadurch entstehen rosettenartige Zellaggregate, welche als Exflagellationszentren bezeichnet werden und *in vitro* lichtmikroskopisch sichtbar sind (Abb. 1.6). Die molekularen Mechanismen, welche zur Ausbildung von Exflagellationszentren führen sowie ihre genaue Funktion sind bisher jedoch noch nicht gänzlich verstanden. Ob sich männliche und weibliche Gameten bei der Fertilisation zufällig finden oder ein vom Makrogameten ausgehender chemoattraktiver Gradient den Mikrogameten anlockt, ist noch nicht genau geklärt (Übersichtsartikel Pradel, 2007). Bei der Befruchtung verschmelzen die Plasmamembranen der Gameten und der Nukleus des Mikrogameten dringt in die weibliche Zelle ein. Nach erfolgter Kernverschmelzung findet eine Meiose statt aus der eine tetraploide Zygote hervorgeht (Janse *et al.*, 1986). Aus der Zygote entwickelt sich in den darauf folgenden vierundzwanzig Stunden ein motiler Ookinet, der mit seinem Apikalkomplex die peritrophe Membran und das Mitteldarmepithel durchdringt und sich zwischen Epithel und Basallamina einnistet. Hier entsteht aus dem Ookineten eine Oozyste.

Der Ookinet wird als so genanntes „*bottle neck*“-Stadium bezeichnet da er nicht nur dem Milieu des Mitteldarms ausgesetzt ist sowie mehrere Gewebearrieren überwinden muss, sondern auch in direkten Kontakt mit dem Immunsystem der Wirtsmücke kommt.

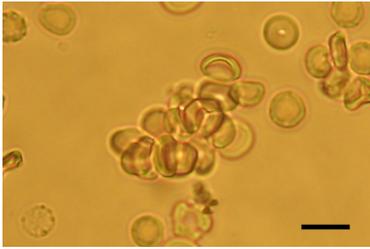


Abb. 1.6. Lichtmikroskopische Aufnahme eines *in vitro* erzeugten Exflagellationszentrums (400-fache Vergrößerung). Größenangabe, 12  $\mu\text{m}$ .

Aus ca. 10.000 Gametozyten entwickeln sich nur etwa 1000 Ookineten und aus diesen entwickeln sich lediglich maximal fünf Oozysten (Sinden, 1999; Sinden und Billingsley, 2001). Dem hohen Selektionsdruck begegnet *Plasmodium* durch Bildung von ca. 1000 haploiden Sporozoiten pro Oozyste. Die Entwicklungszeit der Sporozoiten beträgt eine bis mehrere Wochen und läuft bei höheren Temperaturen rascher ab. Über die Hämolymphe wandern die reifen Sporozoiten zu den Speicheldrüsen, durchdringen die Speicheldrüsenzellen und siedeln sich im Lumen der medianen und distalen lateralen Loben an (Carter und Graves, 1988). Mit der Blutmahlzeit der Mücke werden die Sporozoiten dann mit dem abgesonderten Speichel auf einen weiteren menschlichen Zwischenwirt übertragen und der Zyklus beginnt von neuem.

## 1.3 Impfstoffforschung

### 1.3.1 Immunevasions- und Immunsuppressionsmechanismen von *P. falciparum*

Mit Hilfe der durch das PfEMP1-Protein vermittelten Adhäsion infizierter roter Blutkörperchen an Kapillarendothelien kann sich *P. falciparum* dem Abbau in der Milz entziehen (siehe Kapitel 1.1.2). PfEMP1 wird von der so genannten *var*-Genfamilie kodiert, die aus 60 Genen besteht. Durch sequentielle Variation der PfEMP1-Proteine im Verlauf einer Infektion kann der Parasit einer antikörpervermittelten Immunantwort des Wirtes entgehen (Übersichtsartikel Kraemer und Smith, 2006). Darüber hinaus kommt es durch Bindung an CD36, einem Rezeptor auf Endothelzellen und Makrophagen, zu einer Suppression von Entzündungsantworten.

Die intrazelluläre Lokalisation im Erythrozyten ist ein weiterer Mechanismus der Immunevasion von *Plasmodium*. Menschliche Erythrozyten sind kernlos und können daher keine MHC-I-Moleküle produzieren, die parasitenspezifische Antigene auf der Zelloberfläche präsentieren. Eine Abtötung der infizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen ist somit nicht möglich (Übersichtsartikel Komisar, 2007). Infolge der Präsentation von Epitopen durch den Parasiten, welche die Produktion irrelevanter Antikörper induzieren bzw. die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen supprimieren, wird

das Immunsystem von der Produktion schützender Immunantworten abgelenkt (Gilbert *et al.*, 1998, Plebanski *et al.*, 1999).

Die vielfältigen Immunevasionsstrategien des Malariaerregers erschweren die Entwicklung von effektiven Impfstoffen. Bis heute ist es daher, trotz großer Anstrengungen der Forschung, nicht gelungen, einen marktreifen Impfstoff zu entwickeln. Die Impfstoffforschung verfolgte dabei jahrzehntelang zwei unterschiedliche Ansätze für die Herstellung von Malariavakzinen. Diese zielten entweder auf die präerythrozytären oder die erythrozytären Stadien des Erregers ab. Erst seit ca. zwei Dekaden ist eine weitere Vakzinierungsstrategie in den Fokus der Forschung gerückt. Diese richtet sich gegen die sexuellen Stadien von *Plasmodium* und Impfstoffe dieser Klasse werden als Transmissionsblockierende Vakzine (TBV) bezeichnet (Übersichtsartikel Richie und Saul, 2002; Matuschewski und Müller, 2007; Abb. 1.7). Die drei Impfstoffklassen sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

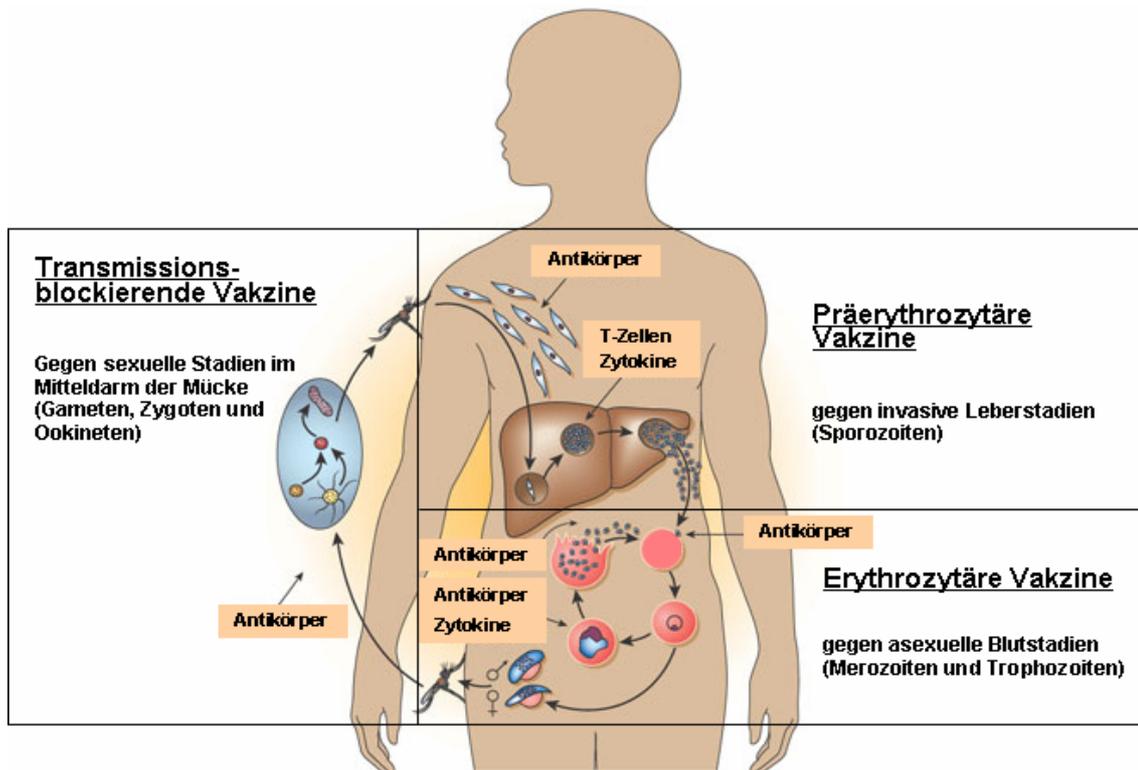


Abb. 1.7. Übersicht der drei Vakzinestrategien in der Malariaforschung. Quelle: Richie und Saul, 2002, verändert.

### 1.3.2 Präerythrozytäre Vakzine

Das Ziel von Impfstoffen dieser Klasse ist die Verhinderung einer Malariainfektion bzw. eine Unterbrechung des Entwicklungszyklus des Parasiten in der Leber, um damit einen Krankheitsausbruch zu unterbinden. Präerythrozytäre Vakzine richten sich dementsprechend entweder gegen infektiöse Sporozoiten, oder gegen die Leber-

stadien des Erregers. Mittels strahlungsattenuierten Sporozoiten konnten Hoffmann und Kollegen im Jahre 2002 erstmals eine sterile Immunität gegen verschiedene *P. falciparum*-Stämme in Probanden induzieren, die zehn Monate aufrecht erhalten werden konnte. Diese Studie hatte Modellcharakter für die präerythrozytäre Impfstoffforschung. In Mäusen gelang es anschließend, eine vollständige sterile Immunität nach Immunisierung mittels UIS-3-*P. berghei* defizienten Sporozoiten zu erzeugen (Müller *et al.*, 2005). Das UIS-3-Gen (*u*pregulated in *i*nfective *s*porozoites *g*ene *3*) ist essentiell für die Entwicklung früher Leberstadien. Jedoch weisen das UIS-3-Gen von *P. berghei* und von *P. falciparum* lediglich eine Sequenzhomologie von 34% auf, womit die Erlangung eines ähnlich viel versprechenden Schutzes im Menschen fraglich ist. Weitere Kandidaten für die Entwicklung einer präerythrozytären Vakzine sind die Oberflächenantigene TRAP (*t*hrombospondin *r*elated *a*dhesion *p*rotein), STARP (*s*porozoite *t*hreonine- and *a*sparagine-*r*ich *p*rotein), CSP (*c*ircumsporozoite *p*rotein) sowie die Leberstadienantigene-(LSA)-1 und -3 (Übersichtsartikel Garcia *et al.*, 2006; Komisar, 2007). Ein viel versprechender Impfstoff namens RTS/S, gerichtet gegen das CSP-Protein von Sporozoiten, befindet sich derzeit in der klinischen Phase III (Übersichtsartikel Matuschewski und Müller, 2007; Greenwood *et al.*, 2008). Bei diesem Impfstoff, der von der Pharmafirma GlaxoSmithKline produziert wird, handelt es sich um ein Fusionsprotein, bestehend aus der C-terminalen Region von CSP, verschiedenen T-Zell-Eptiopen und dem N-terminalen Abschnitt des Hepatitis-B-Oberflächenproteins (Übersichtsartikel Heppner *et al.*, 2005). In einer Studie an mozambikanischen Kleinkindern konnte eine Impfung mit RTS/S das Risiko an Malaria zu erkranken um 37% senken (Alonso *et al.*, 2007). Studien zur Sicherheit und Verträglichkeit der Vakzine wurden bereits durchgeführt, sind jedoch derzeit noch nicht abgeschlossen (Aide *et al.*, 2007; Aponte *et al.*, 2007; Sacarlal *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Erythrozytäre Vakzine

Erythrozytäre Vakzine richten sich gegen die Blutstadien des Parasiten, da diese für Entstehung von Krankheitssymptomen eine Malariainfektion verantwortlich sind. Mit dieser Impfstoffklasse soll die Morbidität und Mortalität der Malaria maßgeblich reduziert werden. Mögliche Angriffspunkte sind hierbei die Oberflächenproteine AMA-1 (*a*pical *m*embrane *a*ntigen) sowie MSP-1, -2, und -3 (*m*erozoite *s*urface *p*rotein) der Merozoiten. Das RESA-*(r*ing *i*nfected *e*rythrocyte *s*urface *a*ntigen)-Protein junger Trophozoiten, welches nach der Infektion des Erythrozyten aus den dichten Granula freigesetzt wird und als oberflächenassoziiertes Protein vorliegt, stellt einen weiteren Kandidaten dar. Alle fünf Impfstoffkandidaten sind bereits Erfolg versprechend im Tiermodell getestet worden (Siddiqui *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1991; Etlinger *et al.*,

1991; Narum *et al.*, 2000; Hisaeda *et al.*, 2002; Lalitha *et al.*, 2008). In klinischen Studien war es möglich, mit der so genannten „Kombination-B“-Vakzine, bestehend aus MSP-1, MSP-2 und RESA, eine spezifische Antikörperproduktion zu induzieren und die Parasitendichte in fünf- bis neunjährigen Kindern aus Papua Neu Guinea um 62% zu senken (Genton *et al.*, 2002). In Impfstudien unter Verwendung der rekombinanten AMA-1-C1-Vakzine konnte bei 92% der Probanden eine spezifische Antikörperproduktion verzeichnet werden (Malkin *et al.*, 2005a). Studien der klinischen Phase 1a und 1b zeigten neben einer starken Antikörperproduktion eine relativ gute Verträglichkeit der verschiedenen Impfstoffe gegen MSP-1 und AMA-1 (Ockenhouse *et al.*, 2006; Withers *et al.*, 2006; Stoute *et al.*, 2007, Hu *et al.*, 2008). Auch die „Kombination-B“-Vakzine erwies sich als gut verträglich (Genton *et al.*, 2003). Derzeit bestehen jedoch immer noch Schwierigkeiten, aufgrund der hohen Antigenvariabilität der verschiedenen *P.-falciparum*-Stämme einen flächendeckend einsetzbaren Impfstoff zu entwickeln. Darüber hinaus bedarf es auch noch einer Optimierung der rekombinanten Antigenproduktion im Großmaßstab sowie der Adjuvantien zur Erzeugung einer adäquaten Immunantwort (Übersichtsartikel Komisar, 2007).

#### 1.3.4 Transmissionsblockierende Vakzine

Da die Bekämpfung der Sexualstadien von *Plasmodium* augenscheinlich weder infizierten Personen dient noch zur Ausrottung des Mückenvektors beiträgt, war die Wissenschaft lange Zeit nicht an der Erforschung dieser Lebensphase des Parasiten interessiert. Seit circa zwei Jahrzehnten ist jedoch das wissenschaftliche Interesse an der Sexualphase der Plasmodien für die Entwicklung transmissionsblockierender Strategien bzw. die Entwicklung Transmissionsblockierender Vakzinen (TBV) erwacht (Übersichtsartikel Carter, 2001; Richie und Saul, 2001; Kaslow, 2002; Matuschewski und Müller, 2007; Saul, 2007). Es wurde erkannt, dass durch die Unterbrechung der Sexualstadienentwicklung in der Mücke die Weiterverbreitung des Parasiten unterbunden werden kann. Ziel der TBV sind sexualstadienspezifische Proteine die im Menschen eine spezifische Antikörperreaktion induzieren, um damit die Parasitenentwicklung in der Mücke zu blockieren. Sexualstadienspezifische Proteine und Enzyme sind darüber hinaus interessante Angriffsziele für die Entwicklung von transmissionsblockierenden Medikamenten. Brechen die Gametozyten nach Aufnahme in die Mücke aus den Erythrozyten aus, sind ihre Oberflächenproteine den Faktoren des menschlichen Immunsystems ausgesetzt. Denn mit der Blutmahlzeit gelangen auch spezifisch induzierte, humane Antikörper und Komplementfaktoren in den Mückenmitteldarm. Binden diese Faktoren an ihre entsprechenden Antigenepitope auf den Sexualstadien, kann eine weitere Entwicklung des Parasiten unterbrochen werden.

Voraussetzung für die Entwicklung einer Transmissionsblockierenden Vakzine ist dabei, dass deren sexualstadienspezifische Zielantigene eine ausreichende Immunantwort hervorrufen, um den Entwicklungszyklus vollständig zu unterbrechen.

Eines der ersten identifizierten sexualstadienspezifische Proteine, welches vor mehr als zwei Jahrzehnten entdeckt wurde, ist *Pfs25*. Dieses Protein wird auf der Oberfläche von Makrogameten, Zygoten und Ookineten exprimiert (Vermeulen *et al.*, 1985, 1986; Kaslow *et al.*, 1988). Das zu *Pfs25* paraloge *Pfs28* wurde knapp zehn Jahre später entdeckt (Duffy und Kaslow, 1997). Diese beiden Proteine konnten auch in *P.-berghei*- und in *P.-vivax*-Parasiten identifiziert werden. Durch Ausschaltung nur eines der beiden Gene für *Pbs25* und *Pbs28* in *P.-berghei*-Parasiten wird die Entwicklung des Erregers in der Mücke nicht unterbrochen. Werden jedoch beide Gene gleichzeitig ausgeschaltet ist die Bildung und Infektiosität von Ookineten reduziert (Tomas *et al.*, 2001). Eine vollständige Unterdrückung der Oozystenbildung von *P. falciparum* konnte nach Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken mit Antikörpern gegen *Pfs25* und *Pfs28* beobachtet werden (Kaslow *et al.*, 1988; Kaslow, 1997; Duffy und Kaslow, 1997). Klinische Studien der Phase I unter Verwendung von rekombinant exprimierten *Pfs25*-Protein zeigten anfänglich jedoch keine ausreichende Antikörperreaktion (Kaslow und Shiloach, 1994; Zou *et al.*, 2003). Durch Einsatz verbesserter Adjuvantien ist es aber kürzlich gelungen, in Rhesusaffen eine stärkere immunogene Wirkung zu erzielen und mittels *Pfs25*-induzierter Immunantwort die Transmission des Parasiten in der Mücke vollständig zu blockieren (Wu *et al.*, 2006). Antikörper gegen rekombinantes *Pvs25*-Protein konnten die parasitäre Entwicklung ähnlich gut inhibieren (Malkin *et al.*, 2005b). Erst kürzlich ist es in einer klinischen Studie der Phase I gelungen, in einem Freiwilligen durch Immunisierung mit rekombinantem *Pfs25*-Protein unter Verwendung des ISA-51-Monatid-Adjuvanz eine starke Antikörperreaktion zu induzieren. Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken mit dem Antiserum des Probanden führten zu einer 90%igen Reduktion der Infektiosität der Mücken gegenüber *P. falciparum* (Wu *et al.*, 2008).

Ein weiteres viel versprechendes sexualstadienspezifisches Protein für die Entwicklung von TBV ist *Pfs230*. Es wird auf der Oberfläche von Gametozyten und Gameten exprimiert (Rener *et al.*, 1983; Quakyi *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1993, 1995, 1996). Immunseren gegen *Pfs230* senken die Infektiosität der Mücken gegenüber *P. falciparum* deutlich ab (Williamson *et al.*, 1995). Die Inkubation von exflagellierenden Kulturen mit Antiseren gegen *Pfs230* in Gegenwart von aktivem Serum inhibiert *in vitro* die Gametenbildung sogar vollständig (Read *et al.*, 1994; Healer *et al.*, 1997; Williamson, 2003). *Pfs230* scheint eine essentielle Rolle bei der Exflagellation männlicher Gametozyten zu haben. Denn männliche *Pfs230-knockout*-(KO)-Parasiten

können zwar noch exflagellieren, ihre Fähigkeit an Erythrozyten zu binden ist jedoch signifikant reduziert. Eine Folge dieser mangelnden Fähigkeit zur Bildung von Exflagellationszentren könnte die im Anschluss beobachtete verminderte Oozystenbildung sein (Eksi *et al.*, 2006). Das *Pfs48/45*-Protein, welches auf der Oberfläche von weiblichen und männlichen Gametozyten und Gameten exprimiert wird, stellt einen weiteren Kandidaten für TBV dar (Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Kocken *et al.*, 1993). Dieses Protein ist über einen GPI-(*glycosyl phosphatidyl inositol*)-Anker an die Oberfläche des Parasiten gebunden (Kumar und Wizel, 1992) und bildet zusammen mit *Pfs230* einen Komplex auf der Plasmamembran der Gametozyten (Kumar 1987; Kumar und Wizel, 1992). Die Motilität und Fähigkeit Makrogameten zu befruchten, ist bei männlichen *Pfs48/45*- und *Pb48/45*-KO-Parasiten stark eingeschränkt. Weibliche *Pfs48/45*- und *Pb48/45*-defiziente Parasiten behalten hingegen ihre Fertilität (van Dijk *et al.*, 2001). In Feldstudien konnte außerdem gezeigt werden, dass Malariapatienten Antikörper gegen *Pfs230* und gegen *Pfs48/45* bilden (Williamson, 2003). Unlängst ist es gelungen, Mäuse mit rekombinantem, in Bakterien exprimiertem *Pfs48/45*-Protein zu immunisieren und damit die Produktion transmissionsblockierender Antikörper zu induzieren (Outchkourov *et al.*, 2007, 2008). TBV werden häufig auch als „altruistische Vakzine“ tituliert, da die krankheitsverursachenden Parasiten sich in einer geimpften Person ungehindert weiter vermehren können und der Immunisierte somit keinen direkten Nutzen aus der Impfung zieht. Diese Bezeichnung lässt die TBV-Strategie in einem negativen Licht erscheinen und ethische Bedenken aufkommen. Die Kritik an TBV relativiert sich jedoch, wenn man ihr Potential näher beleuchtet (Übersichtsartikel Sauerwein, 2007; Dinglasan und Jakobs-Loreno, 2008): Zum einen könnten TBV eine fortschreitende Ausbreitung von Malaria-Epidemien in Regionen mit zeitweiliger Transmission reduzieren. Zum anderen könnten sie zu einer Reduktion multiresistenter Erregerstämme beitragen und damit die zeitliche Nutzbarkeit existierender Antimalariamedikamente verlängern. Durch Kombination von TBV mit Vakzinen gegen präerythrozytäre oder erythrozytäre Stadien würde zudem nicht nur eine Ausbreitung der Erreger reduziert, sondern auch ein unmittelbarer Effekt auf den Krankheitsverlauf erzielt werden. Des Weiteren kämen Impfungen mit TBV v. a. den Familienangehörigen einer geimpften Person zugute. Da Infektionen häufig innerhalb eines Haushalts weitergegeben werden, würde das Neuinfektionsrisiko für den Geimpften somit reduziert werden (Übersichtsartikel Sauerwein, 2007).

Neueste Forschungen legen ihr Augenmerk auch auf die Entwicklung von TBV, die sich gegen Proteine des Mitteldarms oder der Speicheldrüsen der Mücke richten (Übersichtsartikel Lavazec und Bourgouin, 2008; Billingsley *et al.*, 2008). Die

Kombination von transmissionsblockierenden Antikörpern, welche sich sowohl gegen parasitenspezifische als auch mückenspezifische Proteine richten, könnte zusätzlich zu einer Reduktion der Verbreitung des Vektors beitragen. Das Mitteldarm-Antigen, CPBAg1 (*carboxypeptidase B antigen 1*), von *Anopheles* ist bspw. ein möglicher Kandidat für die Entwicklung von TBV, auf der Basis von Antikörpern, welche sich gegen mückenspezifische Antigene richten (Lavazec *et al.*, 2005, 2007). Durch die gleichzeitige Gabe von Kaninchenserum gerichtet gegen rekombinantes CPBAg1 konnte bei Mückenfütterungen mit *P.-falciparum*-Parasiten eine Hemmung der Aktivität von CPB und eine Verminderung der Infektösität der Mücken um mehr als 92% beobachtet werden. Darüber hinaus konnte auch ein Rückgang der Reproduktionsfähigkeit der Mücken nach der Fütterung mit anti-CPBAg1-Antikörpern verzeichnet werden. Der Mechanismus, der zu einer Blockierung der Entwicklung von *Plasmodium* durch die Inhibierung der CPB-Aktivität führt, ist noch nicht vollständig verstanden. Vermutlich ist jedoch CPB für Bereitstellung der für die Parasiten essentiellen Aminosäuren Arginin und Lysin verantwortlich.

## 1.4 Die PfCCp-Proteinfamilie

### 1.4.1 Identifizierung und Aufbau

Die vollständige Sequenzierung des *P.-falciparum*-Genoms (Gardner *et al.*, 2002) sowie der Genome von *P. berghei*, *P. chabaudi* und *P. yoelii* (Carlton *et al.*, 2002, 2005; Hall *et al.*, 2005) eröffneten neue Möglichkeiten zur Identifizierung bisher unbekannter Angriffsziele für die Entwicklung von Impfstoffen und Medikamenten gegen Malaria. Proteomanalysen identifizierten insgesamt 1289 Proteine in *P. falciparum*, welche teilweise sowohl hochkonserviert als auch membranassoziiert sind und sekretorische Signalpeptide enthalten (Lasonder *et al.*, 2002). Von diesen Proteinen werden 315 ausschließlich in Gametozyten, 226 in Trophozoiten und Schizonten und 97 in Gameten exprimiert. Auf der Suche nach multiplen bakterien- oder tierähnlichen, extrazellulären Domänen mit Adhäsionsfunktion im Genom von *P. falciparum* wurde die PfCCp-Proteinfamilie entdeckt.

Die PfCCp-Familie umfasst sechs Proteine, die aus einer Vielzahl adhäsiver Domänen aufgebaut sind. Die namens gebende *Limulus-Coagulation-factor-C*-(LCCL)-Domäne besitzen nur PfCCp1 bis PfCCp5 (Dessens *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2004; Templeton *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2004). Dem sechsten Mitglied dieser Familie, PfFNPA, fehlt die LCCL-Domäne. Es wurde aber aufgrund seiner großen strukturellen Ähnlichkeit zu PfCCp5 mit in die PfCCp-Familie integriert (Pradel *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2004; Abb. 1.8). Vermutlich sind PfCCp5 und PfFNPA aus einem gemeinsamen,

*PfFNPA*-ähnlichen Protein-Vorfahren entstanden und *PfCCp5* könnte erst im Laufe der Evolution in den Besitz der LCCL-Domäne gelangt sein (Pradel *et al.*, 2004). Bei *PfCCp1* und *PfCCp2* handelt es sich hingegen um Schwesterproteine, welche in Folge einer Gen-Verdopplung entstanden sein könnten. Die Gene der *PfCCp*-Familie weisen eine Signalpeptidsequenz auf, was auf eine mögliche Sekretion der kodierten Proteine hindeutet. GPI-Anker und Transmembrandomänen fehlen den *PfCCp*-Proteinen hingegen vollständig (Pradel *et al.*, 2004).

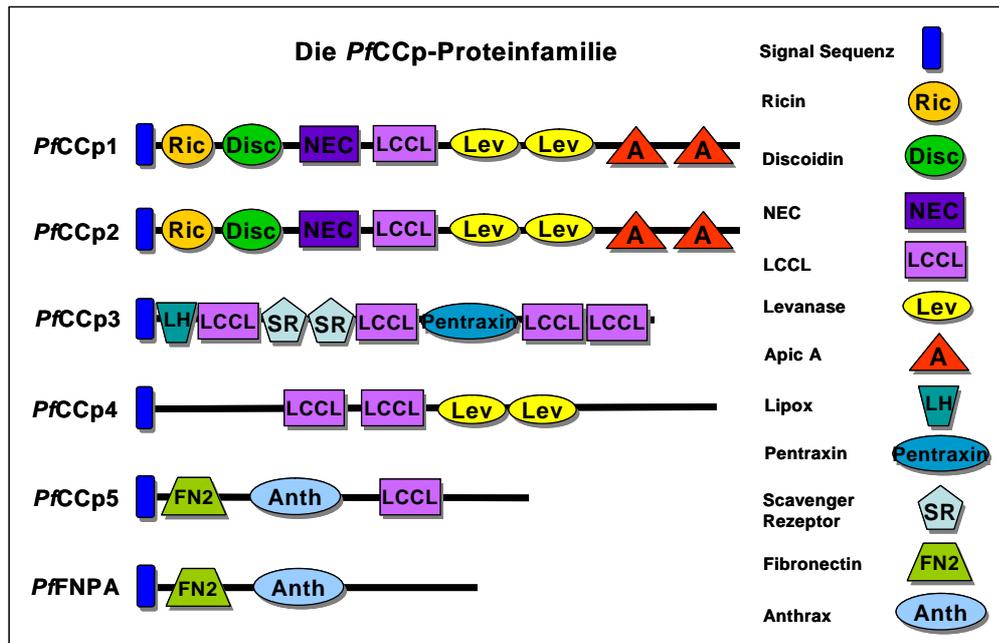


Abb. 1.8. Aufbau der *PfCCp*-Multiadhäsionsdomänenproteine. Quelle: PD Dr. phil. nat. G. Pradel, verändert.

Die LCCL-Domäne erhielt ihren Namen von drei verschiedenen Proteinen und setzt sich aus ca. einhundert Aminosäuren mit vier hoch konservierten Cysteinen zusammen (Trexler *et al.*, 2000). Sie wurde erstmals in dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus* entdeckt, wo sie Bestandteil des Faktors C, dem Zymogen einer sekretierten Serinprotease (Muta *et al.*, 1991) ist. Diese Domäne ist ferner ein Bestandteil des humanen, kochleären Proteins Coch-5b2 sowie des Lungenreifungsproteins Lgl1 der Ratte (Robertson *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1999). Die LCCL-Domäne besteht aus einer zentralen alpha-Helix sowie aus zwei sie umgebenden beta-Faltblättern und findet sich oft in Verbindung mit anderen Modulen extrazellulärer Proteine, welche an Lipid-, Protein-, oder Polysaccharidbindungen beteiligt sind (Trexler *et al.*, 2000; Liepinsh *et al.*, 2001). Das apikomplexaspezifische, cysteinreiche ApicA-Modul und die Neurexin-(NEC)-Domäne wurden erstmals in *PfCCp1* und *PfCCp2* beschrieben. Die NEC-Domäne ist in den konservierten tierischen Oberflächenproteinen Neurexin und Kollagen enthalten und wurde nach ihnen benannt (Pradel *et al.*, 2004). Eine durch

Cystein-Brückenbildung stabilisierte  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tasche könnte ebenfalls an Polysaccharidbindungen beteiligt sein (Spraggon *et al.*, 1997). Auch die in Eukaryonten vorkommende Discoidin-(Disc)- und Ricin-(Ric)-Domänen des *PfCCp1*- sowie des *PfCCp2*-Proteins vermitteln vermutlich Polysaccharidbindungen (Baumgartner *et al.*, 1998; Ponting und Russell, 2000). Eine Beteiligung der Levanase-(Lev)-Domäne, welche in *PfCCp1* und *PfCCp2* aber auch in *PfCCp4* nachgewiesen wurde, an solchen Bindungen ist wahrscheinlich. Die Pentraxin-Domäne von *PfCCp3* wurde bereits in Proteinen, welche bei einer akuten Immunantwort mittels Agglutination, Komplementaktivierung und Phagozytose eine wichtige Rolle spielen, nachgewiesen (Bharadwaj *et al.*, 2001; Claudianos *et al.*, 2002; Dessens *et al.*, 2004). Die SR-Domäne des *PfCCp3*-Proteins wurde als eine mittels Disulfidbrücken stabilisierte Strukturkomponente im extrazellulären Teil sowohl membrangebundener als auch sekretierter Proteine gefunden (Übersichtsartikel Aruffo *et al.*, 1997). Sie ist im Tierreich weit verbreitet und besitzt sechs konservierte, möglicherweise an der Bindung von Peptidliganden beteiligte, Cysteine (Whitney *et al.*, 1995; Claudianos *et al.*, 2002; Delrieu *et al.*, 2002). In Makrophagen ist die SR-Domäne bspw. eine Rezeptorenuntereinheit. Die LH-Domäne von *PfCCp3* könnte an Protein-Lipid-Interaktionen beteiligt sein, denn sie wurde bereits in membran- und lipidassoziierten Proteinen von Pflanzen, Metazoa und pathogenen Bakterien mit dementsprechender Funktion nachgewiesen (Bateman und Sandford, 1999; Claudianos *et al.*, 2002; Delrieu *et al.*, 2002). Nur *PfCCp5* und *PfFNPA* besitzen eine Fibronectin-(FN2)-Domäne, die bisher lediglich in Vertebraten beschrieben werden konnte und dort an der Kollagenbindung aber auch an der Katalyse von Typ-I-Gelatin beteiligt zu sein scheint (Steffensen *et al.*, 1995; Hornebeck *et al.*, 2005). Die Fibronectin-(FN2)-Domäne vermittelt demnach Protein-Protein-Interaktionen. Zusätzlich besitzen sowohl *PfCCp5* als auch *PfFNPA* ein dem N-terminalen Teil des *Anthrax-protective*-Antigens (Anth) ähnliches Motiv (Pradel *et al.*, 2004). Das *Protective*-Antigen (PA) von *Bacillus anthracis* ist ein sekretorisches, wirtszell-rezeptorbindendes Protein, welches auf der Zelloberfläche von Säugerzellen gemeinsam mit dem *Lethal*-Factor (LF) und dem *Edema*-Factor (EF) von *B. anthracis* einen Komplex bildet. Der Komplex wird mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen, wo er seine toxische Aktivität entfaltet (Übersichtsartikel Mourez *et al.*, 2002). Das Anth-Motiv könnte somit möglicherweise an Wirtszellpolysaccharide binden. Zusammengefasst wird allen Domänen der *PfCCp*-Familie eine Beteiligung an Protein-Protein-, Protein-Polysaccharid- oder Protein-Lipid-Interaktionen zugeschrieben. Damit könnten sie eine wichtige Rolle bei Parasit-Parasit- oder Parasit-Wirts-Interaktionen spielen (Pradel *et al.*, 2004, 2006). Innerhalb des Stammes der Apikomplexa wurden Orthologe der *PfCCp*-Proteine z.B. in *Cryptosporidium parvum*, in *Theileria annulata*

und in *Toxoplasma gondii* gefunden (Dessens *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2004; Templeton *et al.*, 2004). In *P. berghei* wurden sie bereits unter dem Namen *PbLAP* (LCCL-*lectin adhesive-like-proteins*) beschrieben (Claudianos *et al.*, 2002; Trueman *et al.*, 2004; Raine *et al.*, 2007). Somit handelt es sich wahrscheinlich um eine funktionell konservierte Proteinfamilie.

#### 1.4.2 Expressions- und Funktionsanalyse der PfCCp-Proteine

Anhand von ersten Transkriptanalysen konnte gezeigt werden, dass alle PfCCp-Proteine, mit Ausnahme von PfCCp5, sexualstadienspezifisch in Gametozyten exprimiert werden (Pradel *et al.*, 2004). Nachfolgende Immunfluoreszenzstudien detektierten eine beginnende Expression aller Proteine der PfCCp-Familie, mit Ausnahme von PfCCp4, im Stadium II reifender Gametozyten, welche die gesamte Gametozytogenese über anhält und nach Aktivierung in den Gameten zurückgeht (Pradel *et al.*, 2004, 2006; Scholz *et al.*, 2008). Dabei wiesen PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 ein punktiertes Expressionsmuster auf und kolokalisierten teilweise an der Außenseite der Plasmamembran (Pradel *et al.*, 2004, 2006; Abb. 1.9).

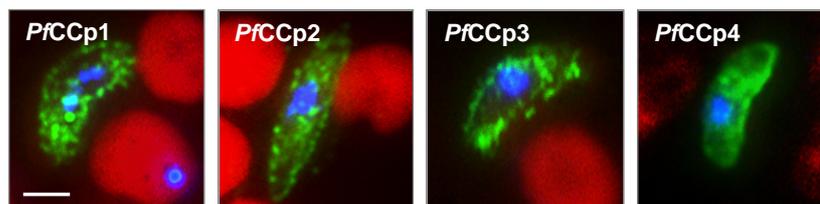


Abb. 1.9. Expression von PfCCp1, PfCCp2, PfCCp3 und PfCCp4 in Gametozyten. Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen zeigten ein punktiertes Expressionsmuster von PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3, während PfCCp4 eine homogene, oberflächenassoziierte Expression aufwies (in Grün; Alexa-Fluor-488). Erythrozyten sind in Rot (*Evans Blue*) und Kernmaterial ist in Blau (*Hoechst Nuclear Stain*) dargestellt. Größenangabe, 2  $\mu$ m. Quelle: Scholz *et al.*, 2008.

Ultrastrukturelle Analysen deckten eine plasmamembranassoziierte Expression von PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 in der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten auf. Für PfCCp4 konnte ebenfalls eine Expression in Gametozyten nachgewiesen werden, jedoch wies dieses Protein eine homogene Oberflächenverteilung auf. Es wird ferner bereits in Gametozyten des Stadium I exprimiert und bleibt auch nach der Aktivierung mit der Oberfläche von Makrogameten assoziiert (Scholz *et al.*, 2008). Alle vier Proteine werden zwar überwiegend in Makrogametozyten exprimiert, sie sind jedoch auch in Mikrogametozyten detektierbar (Scholz *et al.*, 2008).

Mittels Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte des Weiteren eine Ko-Lokalisation von PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten nachgewiesen werden. Ko-Expressionsstudien anhand von PfCCp3-KO-

Parasiten deckten darüber hinaus eine fehlende Proteinexpression von *PfCCp1* und *PfCCp2* in Abwesenheit von *PfCCp3*, trotz vorhandenem Transkripts auf (Pradel *et al.*, 2006). Weitere Untersuchungen ließen dann eine Interaktion von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* während der Reifung der Gametozyten und der anschließenden Gametogenese vermuten (Pradel *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2006). Eine fehlende Expression von *PfCCp1* und *PfCCp2* in *PfCCp3*-KO-Parasiten könnte somit auf einer mangelnden Stabilität und einer damit einhergehenden Degradierung dieser beiden *PfCCp*-Proteine in Abwesenheit von *PfCCp3* beruhen. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass diese drei Proteine *in vitro* während des Ausbrechens der Gametozyten aus den Erythrozyten partiell freigesetzt werden (Abb. 1.10 A+B) und im Verlauf der Gametogenese entstehende Exflagellationskomplexe matrixähnlich umgeben (Abb. 1.10 C).

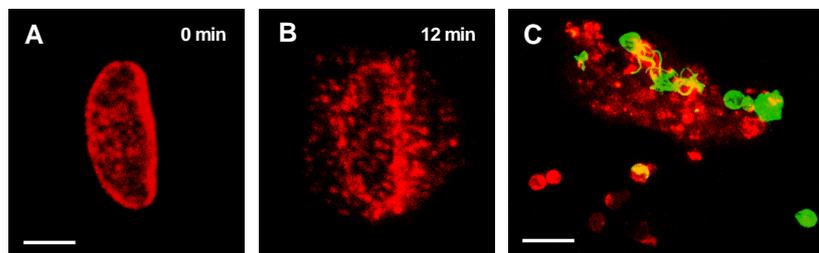


Abb. 1.10. Freisetzung und matrixähnliche Anordnung um Exflagellationskomplexe von *PfCCp1* während der Gametenbildung. A. Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen an einem aktivierten Gametozyten und B. zwölf Minuten nach Aktivierung zur Expression von *PfCCp1* (in Rot; Alexa-Fluor-594). Größenangabe, 2  $\mu\text{m}$ . C. Exflagellationskomplex umgeben von *PfCCp1* (in Rot; Alexa-Fluor-594). Männliche Gameten sind in Grün dargestellt (*Pf*alpha-Tubulin-II; Alexa-Fluor-488). Größenangabe, 20  $\mu\text{m}$ . Quelle: Pradel *et al.*, 2004.

Funktionsanalysen anhand von *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Parasiten zeigten zwar zunächst eine normale Gametozytenreifung und Befruchtung sowie eine unveränderte Sporozoitenentwicklung innerhalb der Oozyste. Die *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Sporozoiten konnten anschließend aber, im Vergleich zu den Wildtyp-(WT)-Parasiten, nicht mehr in den Speicheldrüsen der Mücken nachgewiesen werden (Pradel *et al.*, 2004). Sowohl *PfCCp2* als auch *PfCCp3* scheinen daher eine essentielle Rolle im Lebenszyklus von *P. falciparum* zu spielen. Versuche mit *PfCCp4*-KO-Parasiten zeigten hingegen, dass *PfCCp4* scheinbar keinen Einfluss auf die Vollendung des Lebenszyklus in der Mücke hat (Scholz *et al.*, 2008). Untersuchungen an den *P. berghei*-Orthologen, den *PbCCp*/LAP-Proteinen, zeigten ebenfalls einen Einfluss dieser Proteine auf die Entwicklung von Oozysten bzw. Sporozoiten (Claudianos *et al.*, 2002; Raine *et al.*, 2007). Sowohl die *PbCCp1*/LAP2-, *PbCCp3*/LAP1-KO-Oozysten als auch die Oozysten von *PbCCp4*/LAP6-defizienten Parasiten waren jedoch breits

sieben Tage nach der Membranfütterung signifikant gegenüber den gleichaltrigen WT-Oozysten vergrößert. Raine und Kollegen vermuteten darüber hinaus, dass die *PfCCp/LAP*-Proteine Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus haben könnten (Raine *et al.*, 2007).

Die oben beschriebenen Befunde führten in unserem Labor zur Hypothese, dass *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* sowie evtl. weitere sexualstadienspezifische Proteine über direkte oder indirekte Interaktionen an der Bildung von Proteinkomplexen innerhalb der parasitophoren Vakuole und um entstehende Exflagellationszentren beteiligt sind. Die Hypothese der Komplexbildung wird gestützt durch den Nachweis direkter Interaktionen mittels Affinitätschromatographiestudien unter Verwendung rekombinanter *PfCCp*-Proteine (Wagner *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Exflagellationsrate männlicher Gameten durch die Gabe von gegen *PfCCp1* bis *PfCCp4* sowie gegen *PfFNPA* gerichtete Antikörper bei Anwesenheit des Komplementsystems vermindert ist (Scholz *et al.*, 2008). Eine Funktion der *PfCCp*-Proteine während der Exflagellation bzw. während der Befruchtung ist daher ebenfalls denkbar.

Aufgrund ihrer sexualstadienspezifischen Expression und ihrer essentiellen Rolle während der Entwicklung der Parasiten in der Mücke stellen daher zumindest *PfCCp2* und *PfCCp3* potentielle Kandidaten als Komponenten transmissionsblockierender Vakzine dar. Jedoch bedarf es derzeit noch einer genaueren Funktionsanalyse sowohl dieser beiden Proteine als auch der übrigen Mitglieder der *PfCCp*-Familie, um diese Hypothese zu untermauern und ihre Eignung als TBV-Kandidaten zu evaluieren.

## 1.5 Wirkstoffforschung

### 1.5.1 Klassische Malariamedikamente und Resistenzmechanismen

Die Malaria tropica heilt nicht von selbst aus und muss daher medikamentös behandelt werden. Im 17. Jahrhundert wurde hierzu erstmals das Chinin, bei dem es sich um ein Alkaloid aus der Rinde des Baumes *Cinchona officinalis* handelt, nach Europa eingeführt. Zusammen mit dem Antibiotikum Doxycyclin wird es heute noch zur schnellen Behandlung der schweren Form der Malaria verwendet (Löscher *et al.*, 2003). Die neuesten, auf dem Markt erhältlichen Antimalariamittel auf der Basis des aus dem chinesischen Beifuss (*Artemisia annua*) gewonnenen Artemisinin, bieten ebenfalls gute Therapiemöglichkeiten. Allerdings sind die Derivate des Artemisinin zur Behandlung schwangerer Patientinnen umstritten (White *et al.*, 2008).

Klassische, auf dem Markt erhältliche, Malariamedikamente werden in vier Wirkstoffklassen eingeteilt: 4-Aminoquinoline, 8-Aminoquinoline, Folatantagonisten und

Arylaminoalkohole (Übersichtsartikel Schlitzer, 2007, 2008; Greenwood *et al.*, 2008). Darüber hinaus werden derzeit aber auch Inhibitoren der Atmungskette und immer häufiger Antibiotika sowie Artemisinin-derivate zur Therapie von Malaria eingesetzt (Owusu-Agyei *et al.*, 2008). Zu den 4-Aminoquinolinen zählt Chloroquin, das bekannteste Malariamedikament, und Amodiaquin, welche die Hämdetoxifikation asexueller Blutstadien inhibieren (Saliba *et al.*, 1998). Der Wirkmechanismus der 8-Aminoquinoline ist noch weitgehend unbekannt, sie richten sich jedoch, im Gegensatz zu anderen Malariamedikamenten, gegen asexuelle Leberstadien und gegen sexuelle Blutstadien von *Plasmodium*. Hierzu zählen Primaquin und Tafenoquin, das ein Derivat des Primaquins ist. Tafenoquin hat eine höhere antiplasmodiale Aktivität als Primaquin und ist auch gegen asexuelle Blutstadien und Hypnozoiten aktiv (Ramharter *et al.*, 2002; Schlitzer, 2007). Diese beiden Wirkstoffe werden v. a. zur Chemoprophylaxe einer durch *P. falciparum* und *P. vivax* induzierten Malaria verwendet. Allerdings können sowohl Primaquin als auch Tafenoquin bei Menschen mit einer G6PD-(*glucose 6 phosphat dehydrogenase*)-Defizienz eine Hämolyse als unerwünschte Nebenwirkung verursachen (Schlitzer, 2008). Das erste im Jahre 1865 synthetisch entwickelte Malariamedikament ist Quinin, welches zu der Klasse der Arylaminoalkohole gehört (Schlitzer, 2007). Dieser Wirkstoff hemmt wahrscheinlich die Hämdetoxifikation asexueller Blutstadien des Parasiten (Hempelmann, 2007; Kumar *et al.*, 2007). Quinin verursacht jedoch eine Vielzahl von Nebenwirkungen, wird aber heute noch in Kombination mit den Antibiotika Clindamycin, Doxycyclin und Tetracyclin zu Malariatherapie eingesetzt. Weitere zur Behandlung von Malaria verwendete Arylaminoalkohole sind die Quininderivate Lumefantrin, Halofantrin und Mefloquin. Folatantagonisten, wie die Kombinationspräparate Fansidar<sup>®</sup> (Pyrimethamin und Sulfadoxin) und LapDap<sup>®</sup> (Dapson und Chlorproguanil) greifen in die Pyrimidinsynthese asexueller Blutstadien von *Plasmodium* ein. Pyrimethamin inhibiert hierbei die Dihydrofolatreduktase (DHFR) und Sulfadoxin die Dihydropteroatsynthese (DHPS), zwei für die Pyrimidinsynthese essentielle, parasitenspezifische Enzyme (Schlitzer, 2007). Gegen beide Wirkstoffe bilden jedoch weltweit immer mehr Plasmodienstämme Resistenzen aus.

Artemisinin und seine Derivate sind die derzeit wirkungsvollsten Malariamedikamente, die sowohl zu Prophylaxe als auch zur Therapie eingesetzt werden. Die WHO erklärte im Jahre 2001 die so genannte *Artemisinin based Combination-Therapy* (ACT) zur bevorzugten Behandlungsmethode bei einer Malariainfektion. Diese Wirkstoffe erweisen sich als besonders effektiv gegen chloroquinresistente Stämme. Ihr genauer Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht aufgeklärt (Abdin *et al.*, 2003). Vermutlich bewirken Artemisinine die Bildung freier Radikale, die bei der Blockierung der ATP-

abhängigen Kalziumpumpe PfATP6, welche am Endoplasmatischen Retikulum der Parasiten lokalisiert ist, beteiligt sind (Fidock *et al.*, 2004; Schlitzer, 2007). Sie hemmen alle Entwicklungsstadien der Malariaerreger. Trotz ihrer hohen Wirkeffektivität, ist jedoch der Einsatz der Artemisininderivate nicht unbedenklich, da sie rasch zu Dihydroartemisinin reduziert werden, dass im Verdacht steht, neurotoxisch zu sein (Martin und Kirk, 2004). In Abb. 1.11 sind noch einmal die wichtigsten Antimalariamedikamente und ihre bisher bekannten Zielstrukturen in den asexuellen Blutstadien von *Plasmodium* dargestellt.

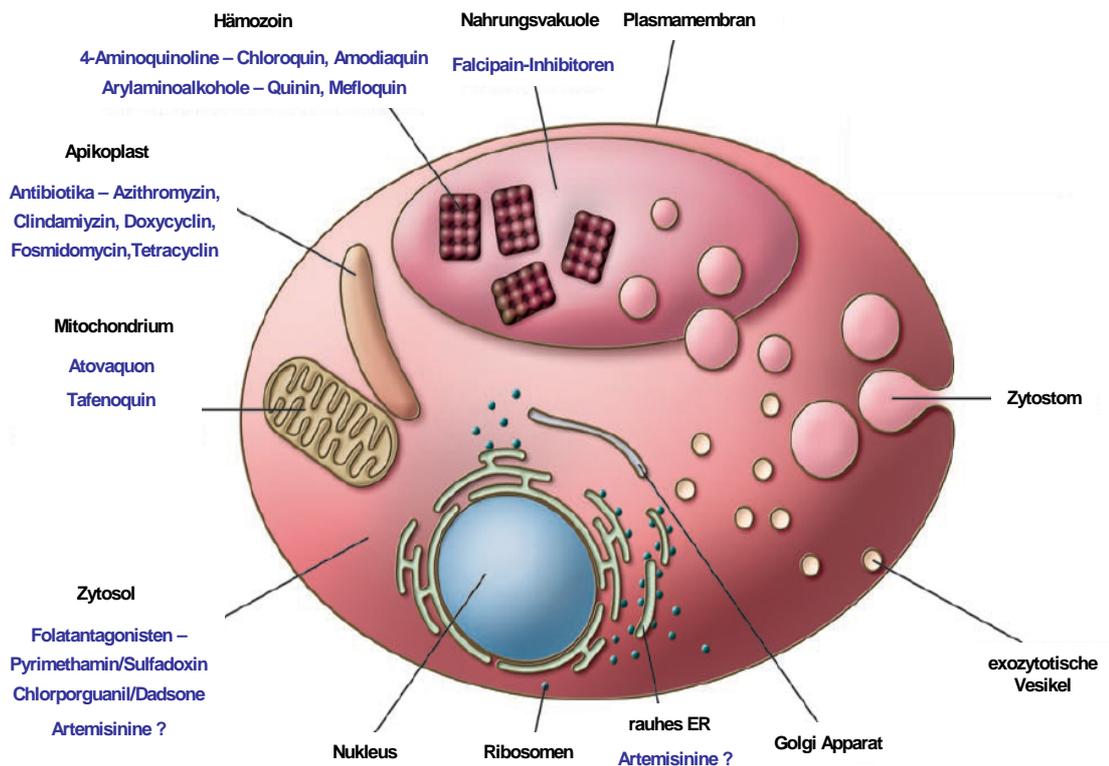


Abb. 1.11. Zielstrukturen der Antimalariamedikamente in asexuellen *Plasmodium*-Blutstadien. Quelle: Greenwood *et al.*, 2008, verändert.

Gegen die meisten der oben beschriebenen Therapeutika bestehen derzeit weitverbreitete Resistenzen. Aus Tansania wurden kürzlich sogar Resistenzen gegen sämtliche bekannten Malariamedikamente berichtet (Schönfeld *et al.*, 2007). Ursächlich für die Ausbildung von Resistenzen sind zum einen Mutationen im Genom des Erregers, welche die Zielstruktur des Wirkstoffes so verändern, dass diese nicht mehr erkannt wird. Zum anderen treten häufig Punktmutationen in den Transportern auf, welche das Chemotherapeutikum in die Zelle bzw. Nahrungsvakuole einschleusen, sodass dieses entweder nicht mehr an seinen Wirkungsort gelangt, oder aus diesem wieder entfernt wird und somit nicht mehr seine volle Wirkung entfalten kann. Ein Beispiel hierfür sind Punktmutationen in der kodierenden Sequenz des

*PfCRT*-(*chloroquine resistance transporter*), die nicht nur für die Resistenz gegenüber Chloroquin, sondern auch gegenüber Quinin, Halofantrin und Artemisinin verantwortlich sind (Vaderramos und Fidock, 2006). Die exakten biochemischen Abläufe, die aus einer Mutation im *PfCRT*-Reporter resultieren und damit zu einer Herabsenkung der Chloroquinsensitivität führen, sind bisher aber noch nicht genau verstanden. Der *PfMDR1*-(*multidrug resistance 1*)-Transporter unterliegt ebenfalls häufig Punktmutationen, die für die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Chloroquin, Mefloquin, Halofantrin, Lumefantrin und Quinin verantwortlich sind (Vaderramos und Fidock, 2006). Des Weiteren wird vermutet, dass Mutationen im *PfATP6*-Gen zu einer Ausbildung einer Artemisininresistenz führen. Die Resistenz gegenüber Pyrimethamin und Cycloguanil liegt in einer Punktmutation im *PfDHFR*-(*Dihydrofolatreduktase*)-Gen begründet, wodurch das Enzym seine Substrataffinität gegenüber dem Wirkstoff verliert (Le Bras und Durand, 2003).

Die zahlreichen Resistenzen gegen gängige Antimalariamedikamente sowie die teilweisen starken Nebenwirkungen der zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika verdeutlichen die Notwendigkeit, neue therapeutische Angriffsziele zur Behandlung der Malaria aufzudecken, um wirkungsvollere Medikamente entwickeln zu können. Zu den viel versprechendsten neuen Angriffspunkten für Chemotherapeutika zählen die Proteasen der Nahrungsvakuole. Zu ihnen zählen auch die beiden Cysteinproteasen Falcipain-2 und Falcipain-3, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden sollen.

### **1.5.2 Die plasmodialen Cysteinproteasen Falcipain-2 und Falcipain-3**

Die Cysteinproteasen parasitischer Protozoen sind an zahlreichen essentiellen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Sie spielen nicht nur bei der Invasion des Wirtes und bei der Nährstoffversorgung des Parasiten eine wichtige Rolle, sondern schützen ihn auch vor den Angriffen des wirtseigenen Immunsystems (Übersichtsartikel Otto und Schirmeister, 1997). Diese Enzyme besitzen in ihrem katalytischen Zentrum ein Cystein, das Proteine mittels nukleophilen Angriffs am Kohlenstoffatom der peptidischen Carboxylgruppe hydrolysiert (Berg *et al.*, 2003). Cysteinproteasen werden in so genannte Clans unterteilt (Barrett und Rawlings, 2001). Die wichtigsten Cysteinproteasen parasitischer Protozoen gehören dem Clan CA und dem Clan CD an. Innerhalb der Clans wird weiterhin, aufgrund von Sequenzhomologien sowie Ähnlichkeiten in der Tertiärstruktur, zwischen verschiedenen Familien differenziert.

Die Falcipaine, Falcipain-1, Falcipain-2, Falcipain-2' und Falcipain-3 (FP-1, 2, 2' und 3) sind die best untersuchtesten Cysteinproteasen des parasitischen Protozoen

*P. falciparum*. Sie werden innerhalb des Clans CA der Familie C1 (Papain-Familie), dem auch die erste charakterisierte und strukturell aufgeklärte Cysteinprotease (Papain) angehört, zugeordnet (Übersichtsartikel Rosenthal, 2004). Die nukleophilen Eigenschaften der Thiol-Gruppe des Cysteins der Papain-Familie werden zusätzlich durch den Imidazol-Ring eines Histidins, mit dem es eine katalytische Diade bildet, verstärkt (Sajid und McKerrow, 2002). Dieses Ionenpaar wird außerdem durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Asparagin stabilisiert (Lecaille *et al.*, 2002).

Die katalytischen Domänen von FP-2, 2' und 3 weisen eine Sequenzhomologie von 99% (FP-2, 2') und 68% (FP-2, 3) auf. FP-1 unterscheidet sich hingegen deutlich in Sequenz und Funktion von den anderen drei Falcipainen (Übersichtsartikel Rosenthal, 2004). Die Enzyme FP-2 und -3 lokalisieren in der Nahrungsvakuole und sind vermutlich an der Hämoglobin-Hydrolyse beteiligt, da sie *in vitro* in saurem Milieu Hämoglobin spalten (Shenai *et al.*, 2000, Sijwali *et al.*, 2001). Beide Enzyme werden in den metabolisch am höchsten aktiven Trophozoiten-Stadien des Erregers maximal exprimiert und aktiviert. Dabei ist wahrscheinlich FP-2 für über 90% der Cysteinprotease-Aktivität in Trophozoiten verantwortlich (Shenai *et al.*, 2000). Durch Inkubation von *P.-falciparum*-Blutstadien *in vitro* mit den Cysteinprotease-Inhibitoren E64 oder Leupeptin kann das Hämoglobin nicht mehr abgebaut werden und es kommt zu einem Anschwellen der Nahrungsvakuole und letztlich zum Absterben der Parasiten (Dluzewski *et al.*, 1986; Rosenthal *et al.*, 1988; Bailly *et al.*, 1992). Der Abbau von Hämoglobin zur Bereitstellung von für den Parasiten essentieller Aminosäuren findet wahrscheinlich über eine Hydrolysekaskade unter Beteiligung verschiedener Proteasen statt (Coombs *et al.*, 2001). An dieser sind, neben FP-2 und -3, auch Aspartatproteasen (Plasmepsine) sowie eine Metalloprotease (Falcilysin) beteiligt. Neuere Daten deuten dabei auf eine Aktivierung der Plasmepsine durch die Falcipaine FP-2, FP-2' und FP-3 in der Nahrungsvakuole von Plasmodien hin, welche so den hydrolytischen Abbau des Hämoglobins in Gang setzen (Drew *et al.*, 2008). In Abb. 1.12 ist der mutmaßliche Kaskadeweg für den Abbau von Hämoglobin und die Transportwege der Spaltprodukte dargestellt.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass FP-2 *in vitro* die Erythrozyten-Membranproteine Ankyrin und Protein 4.1 bei neutralem pH spaltet (Raphael *et al.*, 2000; Dua *et al.*, 2001; Hanspal *et al.*, 2002), so dass FP-2 wahrscheinlich auch an der Erythrozyten-Ruptur zur Freisetzung der Merozoiten beteiligt ist. FP-2' zeigt *in vitro* fast identische Hämoglobinabbauraten. Die FP-2'-Protease kann jedoch in FP-2-defizienten Parasiten die mangelnde FP-2-Aktivität nicht vollständig kompensieren (Sijwali und Rosenthal, 2004; Singh *et al.*, 2006). FP-1 scheint hingegen keine essentielle Rolle in den asexuellen Stadien des Parasiten zu haben und ist vermutlich auch nicht maßgeblich

am Hämoglobinabbau beteiligt (Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Sijwali *et al.*, 2004). In Untersuchungen anhand von FP-1-KO-Parasiten konnte jedoch eine 70-90%ige Reduktion der Oozystenbildung von *P. falciparum*, nach Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken, beobachtet werden (Eksi *et al.*, 2004). Eine Inkubation mit dem Cysteinprotease-Inhibitor E64d führte sogar zu einer 80-100%igen Reduktion der Oozystenbildung (Eksi *et al.*, 2007). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Inkubation mit den Cysteinprotease-Inhibitoren bADA und RV112D sowie mit den Serin-Cysteinprotease-Inhibitoren TLCK, TPCK und PMSF *in vitro* einer Reduktion der Mikrogametenbildung zu Folge hat (Rupp *et al.*, 2008). Dies lässt eine Rolle von FP-1 und anderen Cysteinproteasen bei der Entwicklung der Sexualstadien des Parasiten vermuten.

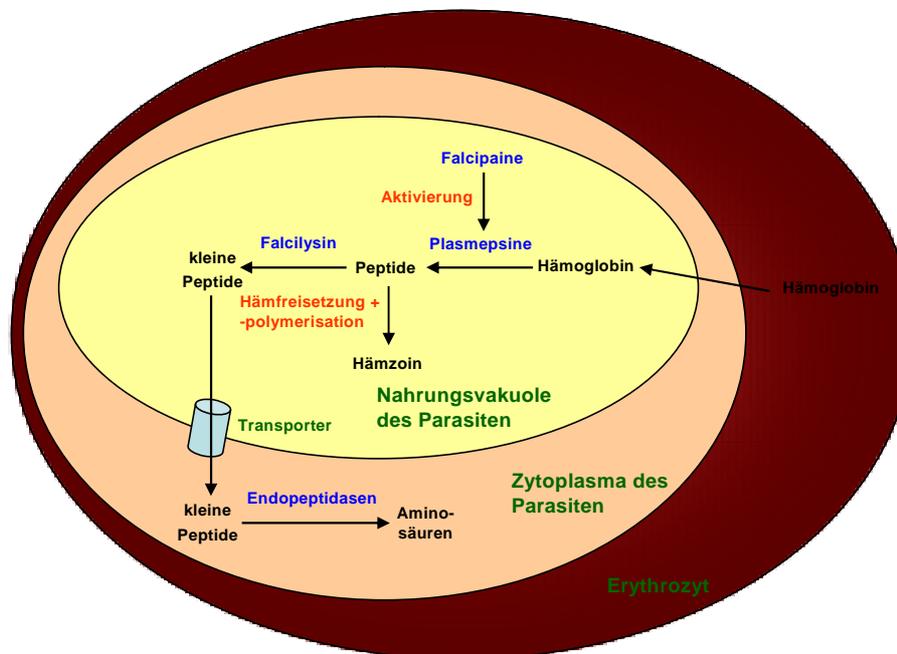


Abb. 1.12. Hämoglobinabbau durch *P. falciparum*. Vermutliche Hämoglobinhydrolysekaskade unter Beteiligung der Falcipaine sowie die Transportwege der Spaltprodukte des Hämoglobins.

### 1.5.3 Cysteinprotease-Inhibitoren

Die meisten Cysteinprotease-Inhibitoren werden nach dem klassischen Substratbasierten Prinzip synthetisiert (Übersichtsartikel Otto und Schirmeister, 1997; Powers *et al.*, 2002). Dies bedeutet, sie besitzen einen Peptidteil, der sich entweder von einem natürlichen Substrat des Enzyms ableitet oder einem natürlich vorkommenden peptidischen Inhibitor, welcher der Protease ähnelt. Des Weiteren besitzen sie eine reaktive, elektrophile Kopfgruppe („warhead“), die mit der Peptidkette verknüpft ist und mit dem Cystein im aktiven Zentrum reagieren soll, um so die katalytische Fähigkeit des Enzyms zu blockieren. Dabei findet eine kovalente, irreversible Bindung des

Inhibitoren (Michael-Reaktion) an das Enzym statt. Diese peptidischen Inhibitoren unterliegen jedoch der Gefahr, selbst von Proteasen hydrolysiert zu werden. Daher geht die Entwicklung von Inhibitoren in eine peptidomimetische Richtung (Übersichtsartikel Powers *et al.*, 2002). Durch Modifikation der Aminosäure-Seitenketten oder durch den Einbau unnatürlicher, proteinogener Aminosäuren erhalten diese als Peptidomimetika bezeichneten Verbindungen eine größere Stabilität und können nicht mehr so leicht hydrolytisch abgebaut werden (Ponte-Sucre, *et al.* 2006; Micale *et al.*, 2006; Ettari *et al.*, 2007). Durch Kopplung des peptidomimetischen Gerüsts an eine besonders reaktive funktionelle Gruppe kann der Inhibitor das Enzym selektiv am Cystein des aktiven Zentrums angreifen.

Eine neue Gruppe der Peptidomimetika, basierend auf dem Grundgerüst von 1,4-Benzodiazepin, wird derzeit intensiv auf ihre Eignung als potentielle Inhibitoren des FP-2 von *P. falciparum* untersucht (Micale *et al.*, 2006; Ettari *et al.*, 2007). Das Antikonvulsivum Diazepam (Valium<sup>®</sup>) ist hierbei wohl das bekannteste Medikament, welches den Wirkstoff 1,4-Benzodiazepin enthält. Dieser ist bereits für seine gute Verträglichkeit bekannt und durch Einfügen eines D-Serin-Glyzin-Motivs kann er FP-2 reversibel hemmen (Micale *et al.*, 2006). Durch Einbau eines Vinylsulfonrests wird aus diesem reversiblen Inhibitor ein irreversibler Inhibitor von FP-2 (Ettari *et al.*, 2007; Abb. 1.13). Die Vinylsulfone binden hierbei kovalent an das Thiol des Cysteins im aktiven Zentrum und inaktivieren so das Enzym (Shenai *et al.*, 2003). Variationen der Seitenketten des Vinylsulfonrests (R und R') könnten eine bessere Passgenauigkeit des Inhibitors in die Bindetasche des Enzyms bewirken.

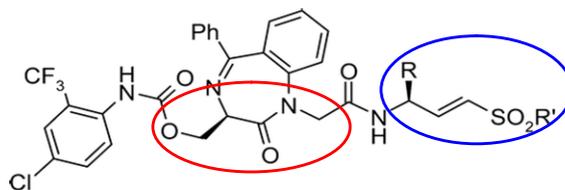


Abb. 1.13. Strukturformel der peptidomimetischen FP-2-Inhibitoren basierend auf einem 1,4-Benzodiazepin-Grundgerüst. 1,4-Benzodiazepin, in Rot; Vinylsulfonrest, in Blau. R und R' kennzeichnen die Positionen der variablen Seitenketten. Quelle: Ettari *et al.*, 2008, verändert.

Eine weitere Klasse von Cysteinprotease-Inhibitoren sind die so genannten nichtpeptidischen Inhibitoren, von denen es bisher nur vergleichbar wenige gibt (Übersichtsartikel Schirmeister und Kaeppeler, 2003; Kaeppeler und Schirmeister, 2005; Ettari *et al.*, 2008; Vale *et al.*, 2008). Der Vorteil in der Entwicklung niedermolekularer, nicht-peptidischer Cysteinprotease-Inhibitoren liegt in ihrer großen Stabilität gegenüber einem hydrolytischen Abbau und einer damit vermutlich einhergehenden besseren peroralen Verfügbarkeit. Eine attraktive Leitstruktur für die Entwicklung neuer

nichtpeptidischer Cysteinprotease-Inhibitoren ist die Etacrynsäure. Sie ist ein bekanntes Schleifendiuretikum (Hydromedin®) und ein schwacher Papain-Inhibitor, wie anhand eines Screenings gezeigt werden konnte (Kaepler und Schirmeister, 2005). Die Etacrynsäure besitzt aufgrund seines  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketons ein Michael-System und sollte daher analog zu den Vinylsulfonen in der Lage sein, Cysteinproteasen durch eine Michael-Reaktion zu inaktivieren. Bisher wurde vermutet, dass die diuretische Wirkung von Etacrynsäure auf einer kovalenten Bindung an Sulfhydrylgruppen von Tubulusproteinen in der Niere beruht. Wahrscheinlich ist Etacrynsäure jedoch ein „Prodrug“, sodass erst der Phase-II-Metabolit, das Cystein-Konjugat, diuretisch wirkt (Palfrey *et al.*, 1993).

Etacrynsäure wurde auch auf ihre Wirkung bei Sichelzellanämie untersucht (Kennedy *et al.*, 1984). Es konnte gezeigt werden, dass sie die Erythrozytenmembran durchquert und kovalent mit dem Sichelzellhämoglobin reagiert, wodurch das Polymer destabilisiert und die Blutviskosität erniedrigt wird. Durch allosterische Bindung dieses Moleküls an Hämoglobin erhöht es dessen Affinität zu Sauerstoff. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Etacrynsäure und mögliche Derivate geeignet sein könnten, gezielt die erythrozytären Stadien von *P. falciparum* in der Wirtszelle zu erreichen, um dort ihre antiplasmodiale Wirkung durch Hemmung der parasitären Cysteinproteasen zu entfalten. Der genaue Wirkungsmechanismus der niedermolekularen Etacrynsäure auf die Cysteinproteasen der Nahrungsvakuole von *P. falciparum* ist jedoch noch nicht bekannt. Durch Modifikation der Etacrynsäure an verschiedenen Positionen sowie der Synthese von Derivaten mit einer Einfachbindung anstelle der aktivierenden Doppelbindung des  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Systems, konnten jedoch erste Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen gegenüber den Cysteinproteasen Papain, FP-2 und FP-3 gewonnen werden (Kaepler und Schirmeister, 2005; Dude *et al.*, 2008; Abb. 1.14). Bis heute befindet sich jedoch noch keiner der gegen FP-2 und FP-3 gerichteten Cysteinprotease-Inhibitoren in der klinischen Phase.

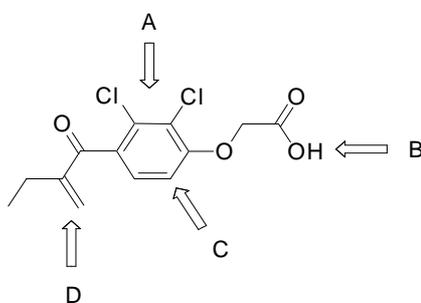


Abb. 1.14. Ansatzpunkte für die Modifizierung der Etacrynsäure-Leitstruktur. A. Veränderung des Substitutionsmusters des aromatischen Ringes. B. Anfügen von Ester- bzw. Amidresten. C. Verlagerung der Doppelbindungs-Seitenkette in die Orthoposition. D. Eliminierung der Doppelbindung. Quelle: Dude *et al.*, 2008.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Trotz intensiver Bemühungen, die Tropenkrankheit Malaria zu bekämpfen, ist sie auch heute noch eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Rasch zunehmende Resistenzbildungen des Malariaerregers gegen gängige Antimalariamedikamente, die vielfach starken Nebenwirkungen erhältlicher Chemotherapeutika und das Fehlen eines Impfstoffes verdeutlichen die Dringlichkeit einer intensiven Suche nach neuen therapeutischen Wirkstoffen zur Behandlung der Erkrankung und der Entwicklung einer Vakzine, welche der Verbreitung des Erregers entgegenwirkt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher zum einen die Eignung zweier Proteine von *P. falciparum* als potentielle Kandidaten für die Entwicklung einer Vakzine näher zu untersuchen und zum anderen durch Analyse der inhibitorischen Wirkung neuartiger Verbindungen auf das Wachstum des Erregers mögliche Wege für die Entwicklung wirksamerer Chemotherapeutika aufzufinden.

Transmissionsblockierende Vakzine könnten einen nachhaltigen Beitrag leisten, die Verbreitung der Krankheit zu unterbinden. Aufgrund ihrer sexualstadienspezifischen, oberflächenassoziierten Expression und der Beteiligung an der Übertragung von *P. falciparum* auf die Mücke stellt die aus sechs Mitgliedern bestehende PfCCp-Proteinfamilie ein mögliches Angriffsziel für die Entwicklung von TBV dar. Ihre multiplen Adhäsionsdomänen sind mutmaßlich an der Bindung von Proteinen, Lipiden und Polysacchariden beteiligt und könnten somit eine Rolle bei der Erkennung von Wirtsliganden oder bei Zell-Zell-Interaktionen spielen. Diese Vermutung wird gestützt durch die Ko-Lokalisation in der parasitophoren Vakuole sowie einer ko-abhängigen Expression von PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 in Gametozyten, gefolgt von der partiellen Freisetzung dieser drei Proteine und ihrer anschließenden matrixähnlich Anordnung um entstehende Exflagellationszentren. Die genaue Funktion der PfCCp-Proteine ist jedoch noch unbekannt und sowohl PfCCp5 als auch PffNPA waren bisher nur hypothetische Proteine.

Ein Focus der vorliegenden Arbeit lag darum auf der funktionellen Charakterisierung der PfCCp5- und PffNPA-Proteine im Lebenszyklus von *P. falciparum*, um ihre Eignung als Kandidaten für die Entwicklung von TBV genauer zu bestimmen. Hierzu sollte ihre Expression auf mRNA-Ebene (mittels RT-PCR) und auf Proteinebene (mittels Immunfluoreszenz- und transmissionselektronenmikroskopischen Studien sowie anhand von Western-Blot-Analysen) in den asexuellen und den sexuellen Stadien von *P. falciparum* untersucht werden. Da die Vermutung bestand, dass insbesondere PfCCp5 - aufgrund des vorhandenen Transkripts in Schizonten - essentiell für die Entwicklung des Parasiten ist, sollten weiterhin PfCCp5- und PffNPA-KO-Parasiten sowie -Komplementations-Mutanten hergestellt werden. Dabei wird im

Unterschied zu den KO-Parasiten bei den komplementierten Parasiten die Funktionsfähigkeit des Zielgens nicht zerstört. Durch die Generierung von Komplementationsmutanten kann jedoch gezeigt werden, dass der Locus für genetische Manipulationen zugänglich ist. Zur Identifizierung möglicher *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Interaktionspartner sollten des Weiteren Bindestudien mit den *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteinen sowie mit weiteren Mitgliedern dieser Proteinfamilie durchgeführt werden. Mittels Affinitätschromatographien unter Verwendung von rekombinant exprimierten Proteinen, die einzelnen, distinkten *PfCCp*-Domänen entsprechen, können hierbei Aufschlüsse über direkte Interaktionen innerhalb der *PfCCp*-Familie gewonnen werden. Anhand von Ko-Immunitationsstudien können hingegen Wechselwirkungen der nativen *PfCCp*-Proteine untereinander aufgedeckt werden.

Peptidomimetische und nicht-peptidische Verbindungen, wie z. B. Etacrynsäure, stehen derzeit im Focus der Wirkstoffforschung. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb die inhibitorische Wirkung von im Rahmen des SFB630 neu synthetisierten peptidomimetischen Substanzen sowie Derivaten der Etacrynsäure auf asexuelle *P. falciparum*-Blutstadien zu ermitteln. Diese potentiellen Cysteinprotease-Inhibitoren können rekombinant exprimiertes FP-2 bzw. FP-3 hemmen. Zur Ermittlung der inhibitorischen Wirkung dieser Verbindungen auf asexuelle Blutstadien mußte zunächst ein *in-vitro*-Screeningsystem auf Basis der Hemmung von plasmodialer Lactatdehydrogenase etabliert werden. Mit diesem Screeningssystem sollte dann die halbmaximale Hemmkonzentration der verschiedenen Inhibitoren unter Verwendung eines chloroquinsensitiven *P. falciparum*-Stammes im Mikrodilutionsverfahren ermittelt werden. Durch Vergleich der halbmaximalen Hemmkonzentrationen mit den vorliegenden Daten zur inhibitorischen Wirkung an rekombinant exprimierten FP-2 und FP-3 können anschließend nähere Aufschlüsse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen erhalten werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Geräte und Anlagen

Tab. 2.1 Verwendete Geräte und Anlagen mit Angabe des Herstellers

Gerät	Hersteller
2-Kanal-Stoppuhr	Oregon Scientific (Portland, USA)
Abzug	Prutscher (München)
AccuJet® pro	Brand (Wertheim)
Aluminiumboxen	Schütt (Göttingen)
Autoklav FOMI B 50	Fedegari (Albuzzano, Italien)
Binokular FB/WPp4	Zeiss (Oberkochen)
Brutschrank Modell 100-800	Memmert (Schwabach)
Bunsenbrenner	Juchheim (Bernkastel-Kues)
Diamantmesser Diatom Ultra 45°	Provac (Oestrich-Winkel)
Drucker Stylus Color 740	Epson (Meerbusch)
Dispenser Multipette® plus	Eppendorf (Hamburg)
Drucker LaserJet 1200	Hewlett Packard (Böblingen)
Eismaschine AS 20	Scotsman (USA)
Elektronenmikroskop EM10	Zeiss (Oberkochen)
Elektrophoresekammer MIDI 1, MAXI	Roth (Karlsruhe)
Elektrophoresekammer Mini-Protean 3	Bio-Rad (München)
Elektroporationsapparatur, Gene Pulser Xcell	Bio-Rad (München)
ELISA Reader Multiskan Ascent	Thermo (Finnland)
Exsikkator Mini 1	Bohlander (Grünsfeld)
Feinwaage GR-200	A & D (Ahrensburg)
Fluoreszenzmikroskop Axiolab HBO 50/AC	Zeiss (Oberkochen)

Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss (Oberkochen)
Folienschweißgerät	Privileg (Fürth)
French <sup>®</sup> Press FA078	Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Gasbrenner Gasi	Schütt (Göttingen)
Geldokumentation Gel Doc 2000	Bio-Rad (München)
Geltrocknungsrahmen 14 x 14 cm	Roth (Karlsruhe)
Gefrierschrank Privileg Öko	Privileg (Fürth)
Heizblock Bio TBD-100, TBD-120	Lab-4you (Berlin)
Inkubator HERAcell	Heraeus (Hanau)
Klimakammer	Genheimer (Höchberg)
Kühlschrank Privileg Öko	Privileg (Fürth)
Konfokales Laserrastermikroskop LSM510	Zeiss (Oberkochen)
Laborglas	Roth (Karlsruhe)
Lichtmikroskop Leica DMLS	Leica (Solms)
Lichtmikroskop Leitz Laborlux 11	Leitz (Wetzlar)
Magnetrührer Typ M 6.1	Marienfeld (Mergentheim)
Messzylinder	Roth (Karlsruhe)
Mikropistill	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskopkamera AxioCam	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskopkamera MP 5000	INTAS (Göttingen)
Mikrowelle	Durabrand, Wal-Mart (Arkansas, USA)
Mischroller RM 5.40	Karl Hecht KG (Sondheim)
Mini-Schüttler PSU-2T plus	Lab-4you (Berlin)
Multikanalpipette 100 µl	Eppendorf (Hamburg)
Multikanalpipette 200 µl	Socorex (Champ-Colomp, Schweiz)
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen)
PCR-Thermocycler primus 25 advanced	Peq-Lab (Erlangen)
pH-Meter inoLab	WTW (Weilheim)
Photometer Ultrospec 3100 pro UV/visible	Amersham Bioscience (München)
Photometer Nanodrop <sup>™</sup> 1000	Peqlab (Erlangen)

Pinzetten	Provac (Oestrich-Winkel)
Pipettensatz	Eppendorf (Hamburg)
Objektträger-Strecktisch OTS 40	Medite (Burgdorf)
Quarzküvette 1000	Roth (Karlsruhe)
Rollenmischgerät RM5 WTE	Karl Hecht KG (Sondheim)
Rotator Rotary-Mixer	Labinco, DG (Breda, Niederlande)
Scanner Perfection 4990 Photo	Epson (Meerbusch)
Schüttler SM 30 control	Edmund Bühler GmbH (Tübingen)
Sequenzierer ABI Prism® 3100	Applied Biosystems (Darmstadt)
Speed Vac® SC110	Thermo Scientific Savant (Langenselbold)
Spülmaschine Mielabor G7783	Miele (Gütersloh)
Sterilbank HERAsafe	Heraeus (Hanau)
Stromquelle PowerPac™ HC High Current Power Supply	Bio-Rad (München)
Stromquelle E 835	Consort (Thumhout, Belgien)
Summenzähler T120	Baumer, IVO (Villingen- Schwenningen)
Tiefkühlschrank HERAfreeze	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Transmissionselektronenmikroskop EM10	Zeiss (Oberkochen)
Ultramikrotom MT-7000 ULTRA	RMC (Tuscon, USA)
Ultraschallgerät Sonoplus HD70	Bandelin (Berlin)
Ultrazentrifuge Beckmann J2-HC	Beckmann (München)
Vakuumpumpe Laboport	KNF (Freiburg)
Vortexer Power Mix Model L46	Labinco (Breda, Niederlande)
Vortexer Biovortex V1	Lab-4you (Berlin)
Waagen 440-47N und 440-33	Kern & Sohn GmbH (Balingen- Frommern)
Wasseraufbereitungssystem TKA LAB HP Typ 08.2203	TKA (Niederelbert)
Wasserbadinkubator Hecht 3185 WTE	Karl Hecht KG (Sondheim)
Wasserbadinkubator Typ WB20	PD Industriegesellschaft (Dresden)
Western Blot Kammer Mini-Trans-Blot Cell	Bio-Rad (München)

Wippe Mini-Rocker MR1	Lab-4you (Berlin)
Wippe WS-10	Edmund Bühler GmbH (Tübingen)
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus (Hanau)

### 2.1.2 Einwegmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Einwegmaterialien wurden – sofern nicht anders in Tab. 2.2 aufgelistet – von den Firmen BD Falcon (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Flacht), Roth (Karlsruhe) sowie von Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Tab. 2.2 Auflistung der verwendeten Einwegmaterialien mit Angaben des Herstellers

Material	Hersteller
96-Loch Mikrotiterplatten Nunc	Nunc (Wiesbaden)
Amicon® Ultra-15 Zentrifugeneinheiten	Millipore (Schwalbach)
Chromatographiesäulen PolyPrep®	Bio-Rad (München)
Diagnostische Objektträger mit Teflonbeschichtung	Erie Scientific Company (Portsmouth, USA)
Einbettungskapseln BEEM-Cap 0,75 ml	Provac (Oestrich-Winkel)
Einmalkanülen 27G x ¾“	Dispomed (Gelnhausen)
Einmalspritzen 10 ml, 20 ml	Braun (Melsungen)
Kupfernetzchen 75 mesh Ø 3 mm	Provac (Oestrich-Winkel)
Kupfernetzchen-Box Ø 2,3-3,05 mm	Provac (Oestrich-Winkel)
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham Biosciences (Freiburg)
Objektträger geschliffen 90°/Mattrand, 72x26 mm	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Untersuchungshandschuhe (Latex bzw. Nitril) ProLine®	Asid Bonz (Herrenberg)
Veneninfusionsbesteck Venofix®	Braun (Melsungen)
Papier zur Reinigung optischer Gläser	NeoLab (Heidelberg)
Pasteurpipetten 230 mm (mit und ohne Wattebausch im Oberteil)	Hecht-Assistent (Sondheim)
Rasierklingen Gradkopf	Lutz (Solingen)
Spritzen Injekt Luer Solo	Braun (Melsungen)
Sterilfilter Steritop™ 0,22 µm	Millipore (Schwalbach)

### 2.1.3 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Versuchstiere

Verwendete Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem (Darmstadt)  
ATCC (Manassas, USA)  
Biochrom (Berlin)  
BD Falcon (Heidelberg)  
Dako (Hamburg)  
Dianova (Hamburg)  
GE Healthcare/Amersham Bioscience (München)  
Invitrogen/Gibco/Molecular Probes (Karlsruhe)  
Merck/Novagen (Darmstadt)  
Pharmacia/Pfizer (Wien)  
Roth (Karlsruhe)  
Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)  
Sigma/Fluka (Taufkirchen)  
WAK Chemie (Darmstadt)

Verbrauchsmaterialien für die *in vitro* Kultivierung der *Plasmodium-falciparum*-Stämme wurden von den nachstehenden Quellen bezogen:

- Erythrozytenkonzentrat und Serum der Blutgruppe A, Rhesus-positiv; Bayerisches Rotes Kreuz (BRK, Würzburg)
- Humanes Vollblut der Blutgruppe A, Rhesus-positiv, zur Gewinnung von frischem Erythrozytenkonzentrat; freundlicherweise gespendet von Frau Nadine Weckesser und Frau Dipl. Biol. Andrea Kühn
- Zellkulturgas 5% O<sub>2</sub> Typ 2.5, 5% CO<sub>2</sub> Typ 2.5 in Stickstoff Typ 3.5 (50 Liter, kein Prüfgas); Tyczka Industriegase (Würzburg)
- Zellkulturmedium RPMI 1640 + 25 mM HEPES + L-Glutamin + Natriumbicarbonat; Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)

Versuchstiere für die Immunisierung und Gewinnung polyklonaler Antikörper wurden von folgendem Labortierlieferanten bezogen:

- Sechs Wochen alte, weibliche NMRI-Mäuse; Charles River (Sulzfeld)

### 2.1.4 Laborkits und Enzyme

Folgende Kits wurden verwendet:

- *BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems (Darmstadt)
- *Epoxy Embedding Medium Kit*, Fluka (Taufkirchen)
- *QIAamp Blood Mini Kit*, Qiagen (Hilden)
- *QIAprep Spin Miniprep Kit (250)*; Qiagen (Hilden)
- *QIAquick PCR Purification Kit (50)*; Qiagen (Hilden)
- *QIAquick Gel Extraction Kit (50)*; Qiagen (Hilden)
- *QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25)*; Qiagen (Hilden)
- *SuperScript<sup>™</sup> First Strand Synthesis System for RT-PCR*; Invitrogen (Karlsruhe)
- *TOPO TA Cloning Kit<sup>®</sup>*; Invitrogen (Karlsruhe)

Enzyme und Größenstandards wurden bezogen von:

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

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Tab. 2.3 Eingesetzte Puffer und Lösungen mit Angabe der Rezeptur

Bezeichnung	Rezeptur
10% AlbuMaxII-Lösung	5 g AlbuMaxII 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> reinst Lösung eine Stunde bei 37 °C rühren, bis sie vollständig gelöst ist steril filtrieren; Lagerung bei 4 °C
1000 x Ampizillin (0,3 M)	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; Lagerung bei 4 °C
2000 x Blastocidin S HCL (5,4 M)	5mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> reinst steril filtrieren
Blockierungslösung Western Blot	50 ml 1 x TBS 0,5 g BSA (Fraktion V Albumin) 2,5 g Milchpulver
100 x Chloroquin (0,63M)	16,25 g Chloroquin 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> reinst steril filtrieren; Lagerung bei 4 °C

Cytomix-Puffer	8,95 g KCl 0,017 g CaCl <sub>2</sub> 0,76 g EGTA 1,02 g MgCl <sub>2</sub> 0,871 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,68 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <u>7,08 g HEPES</u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf pH 7,6 einstellen; Lagerung bei 4 °C
Detergenzpuffer <i>Inclusion-Body</i> -Aufreinigung	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 2 mM EDTA, pH 8,0 200 mM NaCl 1% Desoxycholinsäure 1% Nonidet P-40
Diaphorase-Lösung	1 mg Diaphorase 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; Lagerung bei -20 °C
Elutionspuffer GST-Aufreinigung	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM reduziertes Glutathion
Elutionspuffer 6xHis/SUMO-Aufreinigung	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 350 mM NaCl 1 mM beta-Mercaptoethanol 250 mM Imidazol 10% Glycerin
Epon	30 ml Epoxy- <i>Embedding</i> -Medium 24 ml DDSA 21 ml MNA 1,5 ml Akzelerator Lösung unter dem Abzug rühren, bis sie homogen ist und in 10 ml Einwegspritzen aliquotieren; Lagerung bei -20 °C Die Lösungen entstammen dem Epoxy-Einbettungsmittel-Kit von Fluka.
Equilibrierungspuffer Western Blot	12,1 g Tris 5,8 g NaCl <u>10,2 g MgCl<sub>2</sub></u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf pH 9,5 einstellen
1000 x Gentamycin (0,1 M)	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> steril filtrieren
Glycerolyte 57	300 mg KCl 517 mg Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Monohydrat, monobasisch 1242 mg Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Anhydrat, dibasisch
1000 x Hypoxanthin (0,4 M)	0,05 g/ml in 1 M NaOH steril filtrieren
IFA-Inkubationslösung	1 x PBS, pH 7,4 0,5% BSA 0,01% Saponin
1000 x Kanamycin (0,1 M)	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; Lagerung bei 4 °C
Lösung 1 <i>Dirty Mini</i>	25 mM Tris/HCl, pH 8,0 50 mM Glucose 10 mM EDTA, pH 8,0 5 mg/ml Lysozym

Lösung 2 <i>Dirty Mini</i>	0,2 N NaOH 1% SDS
Lösung 3 <i>Dirty Mini</i>	3 M KAc, pH 4,8
Lysepuffer Proteinaufreinigung	1,4 ml 5 M NaCl 216 µl 1 M Imidazol 216 µl 20% IGEPAL 20 µl beta-Mercaptoethanol
Lysepuffer <i>Inclusion-Body</i> -Aufreinigung	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,25% Sucrose 1 mM EDTA, pH 8,0
Malstat-Reagenz	19,5 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 0,5 ml 10% Triton-X-100 0,5 g L-Lactat 0,165 g Tris <u>16,5 mg APAD</u> ad 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf pH 9,0 einstellen Lagerung max. sieben Tage bei 4 °C
Methylenblau-AzurII-Lösung	1% Methylenblau 1% Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O 1:1 mit einer 1%igen AzurII-Lösung in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> mischen und filtrieren.
NBT-Lösung	1 mg NBT 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 1:1 mit Diaphorase-Lösung mischen und sofort verwenden.
10 x PAGE-Laufpuffer	29 g Tris 144 g Glyzerin <u>10 g SDS</u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
10 x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <u>2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf pH 7,4 einstellen
PBS-Mix	PBS, pH 7,4 0,5% BSA 0,2% Saponin
4% PFA	2 g PFA 30 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> Lösung auf 50-60°C erhitzen und tropfenweise 1 M NaOH zugeben, bis sich das PFA gelöst hat. Mit 5 ml 10 x PBS und 15 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen.
1000 x Pyrimethamin (0,16 mM)	15 mg Pyrimethamin in 500 µl DMSO lösen 13 µl Pyrimethamin/DMSO in 10 ml RPMI <i>incomplete</i> lösen steril filtrieren; Lagerung bei 4 °C
2 x SDS-Probenpuffer	2,5 ml 500 mM Tris/HCl, pH 6,8 2 ml Glyzerin 4 ml 10% SDS <u>0,5 ml 0,1% Bromphenolblau</u> ad 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

5% SDS-Sammelgel	2,4 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 0,6 ml 30% Acrylamid 1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 12 µl 10% SDS 12 µl 10% APS 4 µl TEMED
12% SDS-Trenngel	3,3 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 4 ml 30% Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 100 µl 10% SDS 100 µl 10% APS 4 µl TEMED
Stopp-Puffer Western Blot	1,2 g Tris <u>0,4 g EDTA</u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf pH 8,0 einstellen
5% Sorbitol	2,5 g Sorbitol 50 ml RPMI- <i>incomplete</i> Sterilfiltrieren
10 x TAE	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure <u>100 ml 0,5M EDTA, pH 8</u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
10 x TBS	12,1 g Tris <u>87,3 g NaCl</u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf pH 7,5 einstellen
TBS-Milch	3 - 5% Milchpulver in 1 x TBS
Transferpuffer Western Blot	3,03 g Tris 14,4 g Glycerin <u>200 ml Methanol</u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Waschpuffer <i>Inclusion-Body-</i> Aufreinigung	0,5% Triton-X-100 1 mM EDTA pH 8,0
Waschpuffer 3 Proteinaufreinigung	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 350 mM NaCl 1 mM beta-Mercaptoethanol 10% Glycerin
Waschpuffer 4 Proteinaufreinigung	50 mM Tris/HCl, pH 6,4 1 M NaCl 1 mM beta-Mercaptoethanol 10% Glycerin 0,1% Laurylsarkonsin
Waschpuffer 5 Proteinaufreinigung	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 350 mM NaCl 1 mM beta-Mercaptoethanol 10% Glycerin 60 mM Imidazol
1 mM Xanthurensäure	0,05 g Xanthurensäure 1 ml 0,5 M NH <sub>4</sub> OH 243 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; Lagerung bei 4 °C

### 2.1.6 Medien und Agarplatten

Verwendete Medien für die Kultivierung der *Plasmodium-falciparum*-Stämme:

Für die *In-vitro*-Kultivierung der *Plasmodium-falciparum*-Stämme wurde RPMI-1640-Medium (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) mit Zusatz von L-Glutamin und 25 mM HEPES (siehe Tab. 2.4) verwendet. Die fertig angesetzten Medien wurden anschließend jeweils 20 Sekunden mit 5% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub> begast und bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Herstellung von serumfreiem RPMI-Medium (RPMI-*Incomplete*-Medium) wurde zunächst 0,05 g Hypoxanthin in 1 l ddH<sub>2</sub>O (Firma Roth) für vier Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Nach Zugabe von HEPES wurde die Lösung eine halbe Stunde gerührt. Im Anschluß erfolgte die Zugabe von RPMI-Pulver (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) (Tab. 2.4). Nach einer weiteren halben Stunde unter Rühren, wurde das Medium sterilfiltriert und ebenso wie das Zellkulturmedium begast sowie bei 4°C gelagert.

Tab. 2.4 Zusammensetzung der Medien für die *In-vitro*-Kultivierung der *Plasmodium-falciparum*-Blutstadien

Medium	Zusammensetzung
A+-Serum, human, für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	Serum steril filtrieren, in 50-ml-Reaktionsgefäße aliquotieren und im Wasserbad bei 55 °C für 50 Minuten hitzeinaktivieren; Lagerung bei -20 °C
A+-Erythrozyten (50% Hämatokrit) für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	Erythrozytenkonzentrat zu je 30 ml aliquotieren, zehn Minuten bei 1300 x g zentrifugieren; Überstand absaugen, auf 50 ml mit RPMI- <i>incomplete</i> auffüllen, zentrifugieren; Waschvorgang zweimal wiederholen; Erythrozyten 1:1 in RPMI- <i>incomplete</i> aufnehmen; Lagerung maximal vier Wochen bei 4 °C
A+-Erythrozyten (50% Hämatokrit) aus humanem Vollblut für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	20 ml Vollblut aus Armvene mit Veneninfusionsbesteck steril abnehmen; Vollblut zehn Minuten bei 1300 x g zentrifugieren; Serum und <i>Buffy-Coat</i> entfernen; Erythrozytenkonzentrat auf 50 ml mit RPMI- <i>incomplete</i> auffüllen, zentrifugieren; Waschvorgang zweimal wiederholen; Erythrozyten 1:1 in RPMI- <i>incomplete</i> aufnehmen; Lagerung maximal zwei Wochen bei 4 °C
A+-Medium, human, für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	500 ml RPMI 1640 50 ml humanes A+-Serum 550 µl 1000 x Hypoxanthin 550 µl 1000 x Gentamycin

AlbuMaxII™-Medium, für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	500 ml RPMI 1640 25 ml 10% AlbuMaxII™-Lösung 550 µl 1000 x Hypoxanthin 550 µl 1000 x Gentamycin
Chloroquin-Medium, für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	50 ml AlbumaxII-Medium 50 µl 100 x Chloroquin
DMSO-Medium, für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	9,5 ml AlbumaxII-Medium 0,5 ml DMSO
Pyrimethamin-Medium, für die <i>P.-falciparum</i> -Zellkultur	50 ml AlbumaxII-Medium 50 µl 1000 x Pyrimethamin
RPMI- <i>incomplete</i> -Medium	10,43 g RPMI-1640-Pulver 5,94 g Hepes <u>0,05 g Hypoxanthin</u> ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Selektionsmedium für <i>P.-falciparum</i> -KO-Parasiten mit Pyrimethamin-Resistenz	500 ml RPMI 1640 50 ml humanes A+Serum 550 µl 1000 x Hypoxanthin 550 µl 1000 x Gentamycin 550 µl 1000 x Pyrimethamin
Selektionsmedium für <i>P.-falciparum</i> -KO/Comp.-Parasiten mit Blastizidin- S-HCL-Resistenz	500 ml RPMI 1640 50 ml humanes A+-Serum 550 µl 1000 x Hypoxanthin 550 µl 1000 x Gentamycin 275 µl 2000 x Blastizidin S HCL

Verwendete Medien und Agarplatten für Kultivierung von *E.-coli*-Bakterienstämmen:

Als Wachstumsmedium für die Kultivierung von *E.-coli*-Bakterienstämmen wurde routinemäßig Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) eingesetzt. Sowohl das LB-Medium als auch der LB-Agar werden nach dem Ansetzen für 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wird dem LB-Medium vor dem Autoklavieren Agar (BD Falcon, Heidelberg) zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden die Medien auf etwa 50 °C abgekühlt und das entsprechende Antibiotikum in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben. Der LB-Agar wurde in Petrischalen gegossen, die nach dem Aushärten über Kopf in einer sterilen Plastiktüte verpackt wurden. Die Lagerung erfolgte für maximal vier Wochen bei 4 °C.

Tab. 2.5 Zusammensetzung der Medien und Agarplatten für die Anzucht von *E.-coli*-Kulturen

Medium	Zusammensetzung
LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl <u>15 g Agar</u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt <u>5 g NaCl</u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml 0,25 M KCl 5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub> <u>20 ml 1 M Glucose</u> ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
------------	--

### 2.1.7 Zelllinien und Bakterienstämme

Verwendete Zelllinien:

- *Plasmodium falciparum* WT NF54: Pyrimethamin- und Chloroquinsensitiv, Stabilat eines Niederländischen Patienten, der von einer per Flugzeug eingeschleppten Mücke infiziert wurde (Ponnudurai *et al.*, 1981)
- *Plasmodium falciparum* 3D7: Pyrimethamin- und Chloroquin-sensitiv, Klon von NF54 (Walliker *et al.*, 1987)
- *Plasmodium falciparum* F12: Pyrimethamin- und Chloroquinsensitiv, Subklon von 3D7, der infolge von Langzeitkultivierung keine Gametozyten mehr bilden kann und in dem kein *Pfg27*-Transkript nachweisbar ist (Alano *et al.*, 1995)
- *Plasmodium falciparum* PfCCp1-KO-Klon 5YE2 (C. Moreira, Simon *et al.*, 2009): Pyrimethaminresistent, auf Basis des Vektors pHHT-TK durch homologe Rekombination mittels *double crossover* hergestellt (Reed *et al.*, 2000; Duraisingh *et al.*, 2002)
- *Plasmodium falciparum* PfCCp2-KO-Klone D11H und F1D (Pradel *et al.*, 2004): Pyrimethaminresistent, auf Basis des Vektors pDT-Tg23 (siehe Kapitel 2.1.8)
- *Plasmodium falciparum* PfCCp3-KO-Klone H3D und I9C (Pradel *et al.*, 2004): Pyrimethaminresistent, auf Basis des Vektors pDT-Tg23 (siehe Kapitel 2.1.8)

Verwendete Bakterienstämme:

- *E.-coli*-Proteinexpressionszellen BL21-CodonPlus<sup>®</sup>-(DE3)-RIL von Stratagene: Genotyp *E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT hsdS* (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*<sup>r</sup>]
- *E.-coli*-Transformationszellen OneShot<sup>®</sup>-Top10-Competent-Cells von Invitrogen: Genotyp F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

### 2.1.8 Plasmide

#### pSUMO/pSMT3:

*Low-copy*-T7-Expressionsvektor mit Kanamycinresistenz, einem N-terminalem 6xHIS-Fragment und SUMO-Chaperonsequenz auf Basis des Plasmids pET28b (Merck/Novagen, Darmstadt; Abb. 2.1). Freundlicherweise von Chris Lima zur Verfügung gestellt (New York, USA).

#### pGEX-4T-1:

*High-copy*-Expressionsvektor mit Ampizillinresistenz und einem GST-Fragment (Amersham Bioscience/GE Healthcare, Freiburg, Abb. 2.2).

#### pDT-*Tg23*:

Vektor zur Herstellung von *P. falciparum*-KO-Parasiten mittels homologer *single-crossover*-Rekombination (Wu *et al.*, 1996). Der Vektor besitzt eine Selektionskassette mit Dihydrofolatreduktase-(DHFR)-Gen von *Toxoplasma gondii*, die Resistenz gegenüber Pyrimethamin verleiht. Basierend auf dem Vektor pBluescript-II-SK (Stratagene, La Jolla, USA) besitzt der pDT-*Tg23* zusätzlich eine Ampizillinresistenz, *low copy* (Abb. 2.3).

#### pCAM-BSD-KO:

Vektor zur Herstellung von *P. falciparum*-KO-Parasiten mittels homologer *single-crossover*-Rekombination. Der Vektor besitzt eine Selektionskassette mit Blastizidin-S-Desaminase-Gen von *Aspergillus terreus*, die Resistenz gegenüber Blastizidin-S-HCL verleiht (Mamoun *et al.*, 1999). Basierend auf dem pDT-*Tg23*-Vektor besitzt er ebenfalls eine Ampizillinresistenz (Abb. 2.4). Freundlicherweise von Prof. Christian Doerig (Glasgow, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

#### pCAM-BSD-Comp:

Vektor zur Herstellung von *P. falciparum*-Comp-Parasiten mittels homologer *single-crossover*-Rekombination. Der Vektor besitzt eine Selektionskassette mit Blastizidin-S-Desaminase-Gen von *Aspergillus terreus*, die Resistenz gegenüber Blastizidin-S-HCL verleiht, sowie eine Ampizillinresistenz. Der Vektor enthält zusätzlich ein C-terminales HA-Tag, gefolgt von der 3'-Untranslatierten-Region (UTR) des *P. berghei-dhfr-ts*-Gens, das eine Expressionsanalyse mittels eines spezifisch gegen das HA-Tag gerichteten Antikörpers ermöglicht (Dorin-Semblat *et al.*, 2007; Abb. 2.5). Freundlicherweise von Prof. Christian Doerig (Glasgow, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

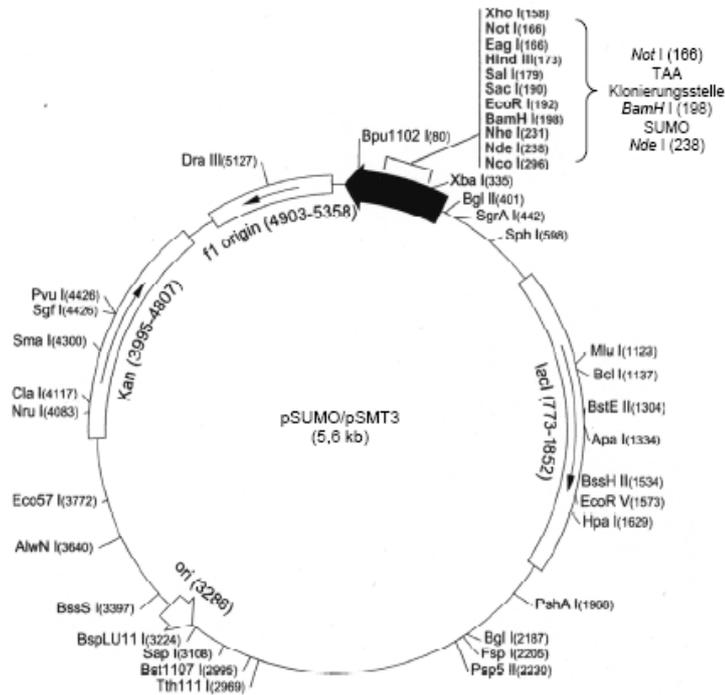


Abb. 2.1. pSUMO/pSMT3-Expressionsvektor mit multipler Klonierungsstelle zur Herstellung von 6xHIS-Fusionsproteinen. Quelle: www.emdbio-science.com, verändert.

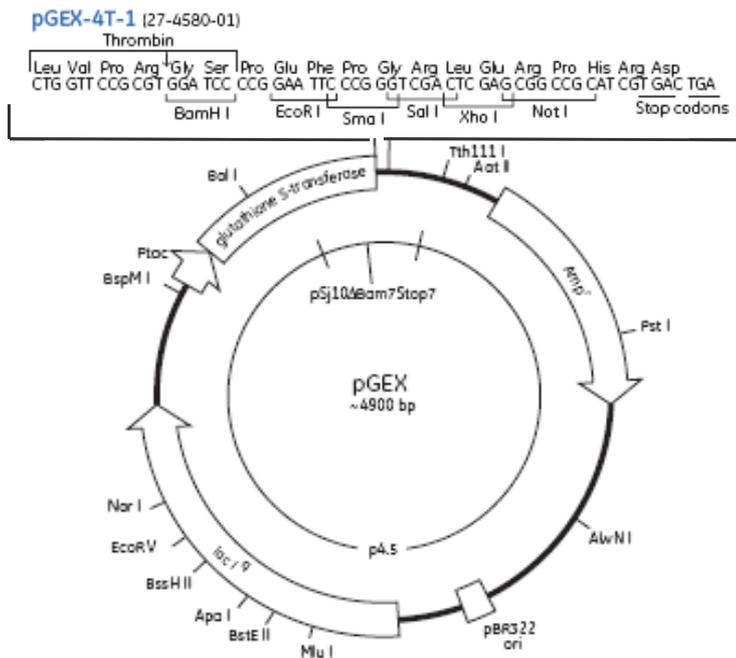


Abb. 2.2. pGEX-4T-1-Expressionsvektor mit multipler Klonierungsstelle zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen. Quelle: www.ge.com, verändert.

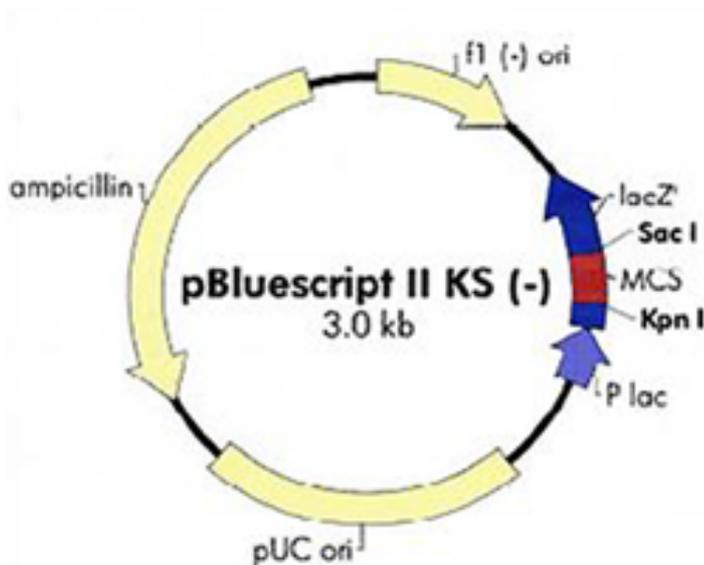


Abb. 2.3. pBluescript-Vektor als Basis des pDT-Tg23-KO-Vektors. Quelle: www.stratagene.com.

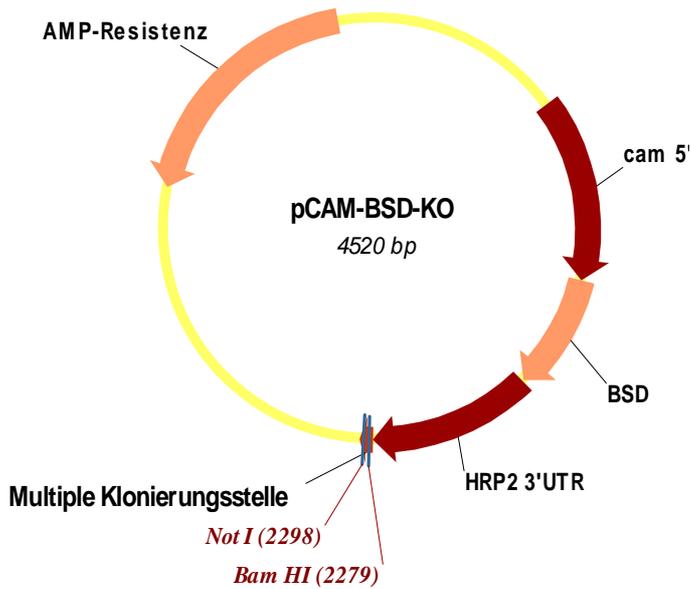


Abb. 2.4. pCAM-BSD-KO-Vektor mit multipler Klonierungsstelle zur Herstellung von *P. falciparum*-KO-Parasiten. Quelle: Dorin-Semblat *et al.*, 2007, verändert.

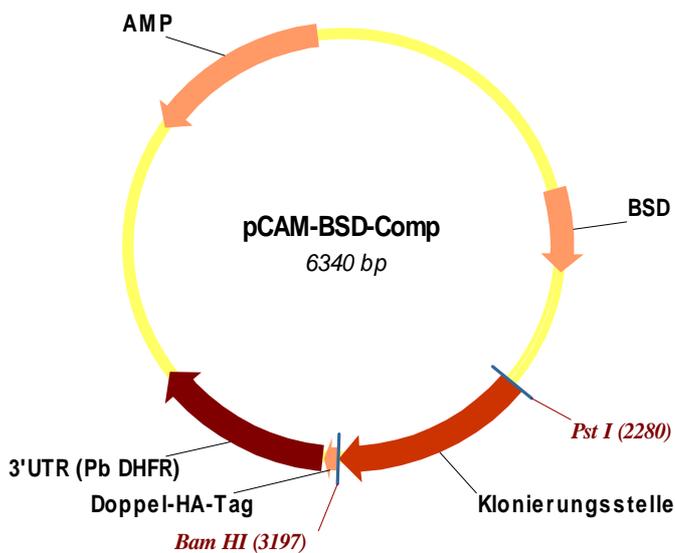


Abb. 2.5. pCAM-BSD-CompVektor zur Herstellung von *P. falciparum*-Comp-Parasiten. Quelle: Dorin-Semblat *et al.*, 2007, verändert.

### 2.1.9 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide, wurden – sofern nicht bereits in unserer Arbeitsgruppe vorhanden – bei der Firma Biomers (Ulm) in Auftrag gegeben.

Tab. 2.6 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Herstellung rekombinanter Proteine	
<i>Pf</i> CCp5 rp1 <i>Sense</i> - <i>Bam</i> HI	aa GGATCC ggt tcg cgc gat tgg gat
<i>Pf</i> CCp5 rp1 <i>Antisense</i> - <i>Not</i> I	tt GCGGCCGC <b>tta</b> gaa tct agt ggg tgg aat

<i>PfCCp5 rp2 Sense2-BamH I</i>	aa GGATCC gta ttc gat acg ggt gat
<i>PfCCp5 rp2 Antisense2-Not I</i>	tt GCGGCCGC <b>tta</b> tgg ttt att cca tcc gta
<i>PfFNPA rp1 Sense-BamH I</i>	aa GGATCC acc gtg gat ggg cgt cta
<i>PfFNPA rp1 Antisense-Not I</i>	tt GCGGCCGC <b>tta</b> cat aaa tgc atg tac ccc
<i>PfFNPA rp2 Sense-BamH I</i>	aa GGATCC tgg gac aca ggg ata cca
<i>PfFNPA rp2 Antisense-Not I</i>	tt GCGGCCGC <b>tta</b> atc tat aca agg tat acc
<b>Oligonukleotide für die Herstellung der <i>PfCCp5</i>- bzw. <i>PfFNPA</i>-KO und der <i>PfCCp5</i>- bzw. <i>PfFNPA</i>-Comp-Konstrukte</b>	
<i>PfCCp5 KO1 Sense Sac II</i>	at CCGCGG ggt tcg cgc gat tgg gat
<i>PfCCp5 KO1 Antisense Not I</i>	ta GCGGCCGC <b>tta</b> ttc taa tgg tcc tct act
<i>PfCCp5 KO BSD1 Sense BamH I</i>	at GGATCC ggt tcg cgc gat tgg gat
<i>PfCCp5 KO BSD1 Antisense Not I</i>	ta GCGGCCGC <b>tta</b> ttc taa tgg tcc tct act
<i>PfCCp5 Comp1 Sense Pst I</i>	at CTGCAG ctc caa taa tta atc caa act
<i>PfCCp5 Comp2 Sense Pst I</i>	at CTGCAG cca aat agt tat tcc att gta
<i>PfCCp5 Comp2 Antisense BamH I</i>	ta GGATCC aat ttt caa tat ttg aag tgc c
<i>PfFNPA KO1 Sense Sac II</i>	at CCGCGG gta cga agt aag gca cgt
<i>PfFNPA KO1 Antisense Not I</i>	ta GCGGCCGC <b>tta</b> ccc gca atc atg atc tac
<i>PfFNPA KO2 Sense Sac II</i>	at CCGCGG acc gtg gat ggg cgt cta
<i>PfFNPA KO3 Antisense Not I</i>	ta GCGGCCGC <b>tta</b> atc gga tgc att acc aca
<i>PfFNPA KO4 Antisense Not I</i>	ta GCGGCCGC <b>tta</b> cac tta gag atg ttg ctt g
<i>PfFNPA BSD KO1 Sense BamH I</i>	at GGATCC gta cga agt aag gca cgt
<i>PfFNPA BSD KO1 Antisense Not I</i>	ta GCGGCCGC <b>tta</b> ccc gca atc atg atc tac
<i>PfFNPA BSD KO2 Sense BamH I</i>	at GGATCC ggg gta cat gca ttt atg
<i>PfFNPA BSD KO2 Antisense Not I</i>	ta GCGGCCGC <b>tta</b> cgt att gac cca gtg att
<i>PfFNPA Comp Sense Pst I</i>	at CTGCAG ggt ata cct tgt ata gat
<i>PfFNPA Comp Antisense BamH I</i>	ta GGATCC gtt atg aag gaa taa tat ctg
<b>Oligonukleotide für die RT-PCR</b>	
<i>PfCCp5 RT2 Sense</i>	cag gag gta tac cat ttc
<i>PfCCp5 RT2 Antisense</i>	gat taa agg caa tcc gtt
<i>PfFNPA RT2 Sense</i>	ttc aaa tac gga tgg gat

<i>PfFNPA RT2 Antisense</i>	ttt gcc cgt agg aga tcc
<i>PfCCp1 RT1 Sense</i>	gaa gat gga gat ggg aaa
<i>PfCCp1 RT1 Antisense</i>	gct gtt caa att ccc atc
<i>PfAMA-1 RT1 Sense</i>	gga tta tgg gtc gat gga
<i>PfAMA-1 RT1 Antisense</i>	gat cat act agc gtt ctt
<i>Pfs25 RT1 Sense</i>	ccc gtt tca tac gct tgt
<i>Pfs25 RT1 Antisense</i>	gca ttt ggt ttc tcc atc
<i>Pfs28 RT1 Sense</i>	agg ctc ggg tta ctg aaa
<i>Pfs28 RT1 Antisense</i>	ttg cag gat cta cta tac
<b>Oligonukleotide für die Sequenzierung und Integrationsnachweis der <i>PfCCp5</i>- und <i>PfFNPA</i>-KO/Comp-Konstrukte</b>	
pET28b <i>Sense2</i>	tat agg gga att gtg agc
pSMT3	gtg gcg ccg gtg atg ccg
M13R	gga aac agc tat gac gat gat
T3	tta acc ctc act aaa ggg
pCAM <i>Sense</i>	tat tcc taa tca tgt aaa tct taa a
pCAM <i>Sense2</i>	tat tcc taa tca tgt aaa tct taa a
pCAM <i>Antisense</i>	tgg agc tcc agc ggt g
pCAM <i>Antisense2</i>	caa tta acc ctc act aaa g
pCAM Comp seq1 <i>Sense</i>	ctg cag atg aat aga att
pCAM Comp seq2 <i>Sense</i>	ttc cta atc atg taa atc tt
pCAM Comp seq2 <i>Antisense</i>	aac gaa cat taa gct gcc
pCAM Comp <i>Antisense</i>	cag gct tta cac ttt atg ctt ccg
pCAM Comp HA <i>Antisense</i>	gca taa tct gga aca tca tat gg
<i>PfCCp5</i> seq1 <i>Sense</i>	gat ggt ata cct ata gaa
<i>PfCCp5</i> seq2 <i>Sense</i>	ggg gtt atg gtc gaa gtt caa tt
<i>PfCCp5</i> wt1 <i>Sense</i>	aga tta tgt gct gca gca
<i>PfCCp5</i> wt1 <i>Antisense</i>	ttc tcc acc taa caa ttc
<i>PfCCp5</i> wt1.1 <i>Sense</i>	gac gga aca agc ggt tcc
<i>PfCCp5</i> wt1.1 <i>Antisense</i>	tgt ccc att atg tgg aac
<i>PfCCp5</i> wt2 <i>Sense</i>	gct tct att cat gca ggt

<i>PfCCp5 3'UTR wt2 Antisense</i>	ttc tat atg acg ttg gtg
<i>PfFNPA wt1 Sense</i>	act agg gca aca gat cct
<i>PfFNPA wt1 Antisense</i>	gga tat gtg tgg att tgc
<i>PfFNPA wt2 Sense</i>	act gac gga ata tcg aca
<i>PfFNPA wt2 Antisense</i>	aat gat gat gcc cag gag
<i>PfFNPA wt3 Sense</i>	tgt acc tac cta cat ata
<i>PfFNPA wt4 Sense</i>	ggt aat gta tct acg cct
<i>PfFNPA wt5 Sense</i>	ccc aaa gct caa aca ggt
<i>PfFNPA 3'UTR wt3 Antisense</i>	tct aca cat gga tt acc

### 2.1.10 DNA-Längen- und Proteinmassenstandards

Verwendete DNA-Längen- sowie Proteinmassenstandards:

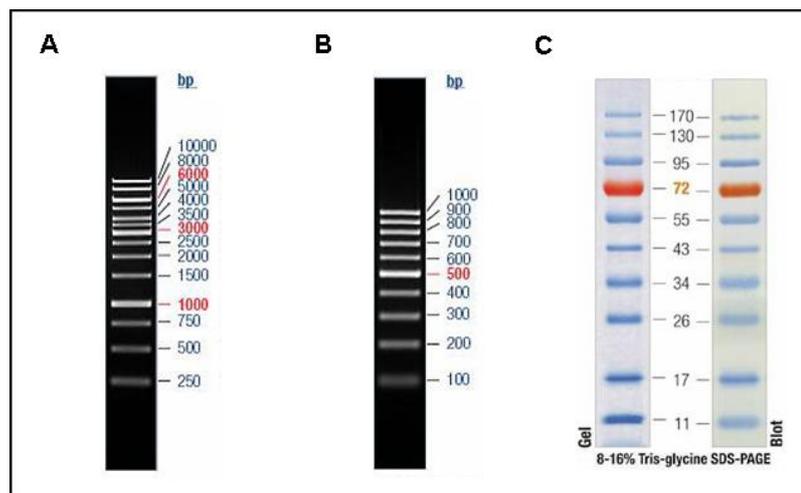


Abb. 2.6. DNA-Längen- und Proteinmassenstandards von MBI/Fermentas. A. *GeneRuler™*-1-kb-DNA Leiter, B. *GeneRuler™*-100-bp-DNA-Leiter; Größenangaben in bp. C. *Page-Ruler™*-pre-stained-Proteinstandard von MBI/Fermentas. Quelle: [www.fermentas.de](http://www.fermentas.de).

### 2.1.11 Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten primären Antikörper wurden entweder in der eigenen Arbeitsgruppe hergestellt (siehe Kapitel 2.1.3.7), oder käuflich von kommerziellen Herstellern erworben bzw. sind freundlicherweise von Prof.

K. C. Williamson (Chicago, USA), Dr. P. Alano (Rom, Italien) und Prof. T. J. Templeton (New York, USA) zur Verfügung gestellt worden.

Für die Transmissionselektronenmikroskopie bzw. Western-Blot-Analysen wurden sekundäre Antikörper eingesetzt, welche mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind, während für Immunfluoreszenzstudien mit einem Fluorochrom gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet wurden.

Tab. 2.7 Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Immunisiertes Tier	Verdünnung		Herkunft
		Western Blot	IFA	
Anti- <i>Pf</i> CCp1/1rp1 polyklonal	Maus	1:200	1:100	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> CCp2/2rp3 polyklonal	Maus	1:200	1:100	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> CCp3/SR polyklonal	Maus	1:100	1:100	Pradel <i>et al.</i> , 2004
Anti- <i>Pf</i> CCp3/3rp3 polyklonal	Maus	1:100	1:100	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> CCp4/4rp1 polyklonal	Maus	1:20	-	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> CCp5/5rp1 polyklonal	Maus	1:50	1:25	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> CCp5/5rp2 polyklonal	Maus	1:100	1:50	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> CCp5/5rp2 polyklonal	Maus	1:50	1:25	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> CCp5/5rp2 polyklonal	Maus	1:50	1:25	Biogenes
Anti- <i>Pf</i> FNPA/FNPArp1 polyklonal	Maus	1:50	1:25	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> FNPA/FNPArp2 polyklonal	Maus	1:100	1:50	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> FNPA/FNPArp2TT polyklonal	Maus	1:50	1:25	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> s230 polyklonal	Maus	1:100	1:100	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti- <i>Pf</i> 39	Maus	1:100	1:100	Williamson <i>et al.</i> , 2008
Anti-GST polyklonal	Maus	1:100	1:100	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti-GST polyklonal	Ziege	1:4000	-	GE Healthcare
Anti-His polyklonal	Maus	1:100	1:100	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Anti-His monoklonal	Maus	1:5000	-	Pharmacia
Anti- <i>Pf</i> s25 polyklonal	Kaninchen	1:500	1:1000	ATCC

Anti- $\alpha$ -Tubulin-II polyklonal	Kaninchen	1:500	1:1000	ATCC
Neutrales Mausserum	Maus	1:100	1:100	Scholz <i>et al.</i> , 2008
Neutrales Ziegenserum	Ziege	1:100	1:100	Sigma
Anti-Maus IgG Alexa-Fluor-488	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Anti-Maus IgG Alexa-Fluor-594	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Anit-Rabbit IgG Alexa-Fluor-488	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Anit-Rabbit IgG Alexa-Fluor-594	Ziege	-	1:1000	Molecular Probes
Anti-Maus IgG akal. Phosphatase	Ziege	1:5000	-	Sigma
Anti-Kaninchen IgG akal. Phosphatase	Ziege	1:5000	-	Sigma

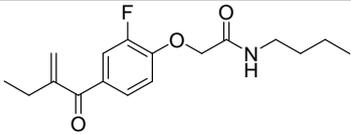
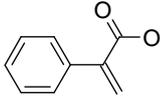
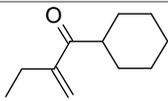
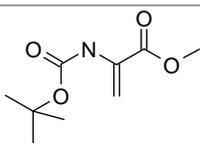
### 2.1.12 PlasmoDB-Identifizierungsnummern

Tab. 2.8 Verwendete Proteine mit ihren zugehörigen PlasmoDB-Identifizierungsnummern

<b>Protein</b>	<b>Identifizierungsnummer</b>
<i>Pf39</i>	PF11_0098
<i>Pf</i> $\alpha$ -Tubulin-II	PFD1050w
<i>PfCCp1</i>	PF14_0723
<i>PfCCp2</i>	PF14_0532
<i>PfCCp3</i>	PF14_0067
<i>PfCCp4</i>	PFI0185w
<i>PfCCp5</i>	PFA0445w
<i>PfFNPA</i>	PF14_0491
<i>Pfs230</i>	PFB0405w
<i>Pfs25</i>	PF10_0303
Falcipain-2	PF11_0162
Falcipain-3	PF11_0161





E-5	307,37	
E-6	166,27	
E-7	148,16	
E-8	201,22	

### 2.1.14 Angewandte Computerprogramme

- Adobe® Acrobat Reader 7.0
- Adobe® Photoshop CS
- Ascent® Software v. 2.6
- BioEdit *sequence alignment version 7.0.5.3*
- Epson Perfection 4990 Photo
- GaphPad Prism 4
- ISIS/Draw 2.3
- NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>)
- NanoDrop® ND-1000 3.2.0
- Microsoft® Excel 2003
- Microsoft® Word 2003
- Microsoft® Powerpoint 2003
- Vector NTI®

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische und zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Alle Bakterienstämme wurden in LB-Medium unter Zugabe des - entsprechend der Selektionsbedingungen - vorgeschriebenen Antibiotikums kultiviert (siehe Kapitel 2.1.8). Anzuchtkulturen von Plasmidpräparationen wurden bei 37 °C (siehe Kapitel 2.2.2.8) bzw. Proteinexpressionen bei Raumtemperatur (RT) (siehe Kapitel 2.2.3.1) und bei 180-220 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Auf Agarplatten ausgestrichene Bakteriensuspensionen wurden über Nacht bei 37 °C kopfüber im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.1.2 Transformation kompetenter Bakterienstämme

Als Transformation wird eine Genübertragung, bei dem isolierte DNA in einen Akzeptororganismus eingeführt wird, bezeichnet. Dem Organismus werden durch die eingebrachte Fremd-DNA neue genetische Eigenschaften verliehen. Als natürlich kompetent werden solche Bakterien bezeichnet, welche unbehandelt in der Lage sind, DNA in die Zelle aufzunehmen. Nicht natürlich kompetente Bakterien können, z. B. durch Behandlung mit Kalziumchlorid, künstlich kompetent gemacht werden. In dieser Arbeit wurden chemisch kompetente *OneShot*<sup>®</sup>-Top10-Zellen für Plasmidpräparationen bzw. BL21-CondonPlus<sup>®</sup>-(DE3)-RIL-Bakterienzellen für Proteinexpression eingesetzt.

Zur Transformation wurden 20 µl der kompetenten Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und mit 100 ng der gewünschten Plasmid-DNA bzw. 2 µl Ligationsansatz in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß vermischt. Nach einer Inkubationzeit von 30 Minuten auf Eis wurde der Ansatz 30 Sekunden lang bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Hierbei werden die Zellmembranen der Bakterien geöffnet und die DNA kann in die Zelle eindringen. Durch nachfolgende zweiminütige Inkubation auf Eis wurden die Membranporen wieder geschlossen. Im Anschluss wurden 200 µl SOC-Medium zugegeben und die Kultur eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Hierbei wurde die eingebrachte Resistenz ausgebildet, wodurch die Kultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert werden konnte. Die Inkubation der LB-Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### 2.2.1.3 Konservierung von transformierten Bakterien

Zur kurzfristigen Konservierung wurden auf Agarplatten ausgestrichene Bakterienkolonien sowie Bakteriensuspensionen zur Plasmidpräparation bei 4 °C für maximal vier Wochen aufbewahrt. Bakterienklone und -suspensionen für die Proteinexpression wurden hingegen nicht länger als zwei Tage bei 4 °C zu Wiederverwendung gelagert, da bei längerer Lagerdauer die Effektivität der bakteriellen Proteinexpression deutlich abnahm.

Für die langfristige Konservierung wurden die gewünschten Bakterienklone oder -kolonien gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Medium/Antibiotikum kultiviert. Von der Bakteriensuspension wurde im Anschluss 800 µl entnommen und mit 200 µl einer 80%igen, sterilen Glycerinlösung vermischt. Die Lagerung dieser Stammkultur erfolgte in Kryogefäßen bei -80 °C.

### 2.2.1.4 Kultivierung, Synchronisierung und Konservierung von *P.-falciparum*-Blutstadien

Die asexuellen *P.-falciparum*-Blutstadien sowie die sexuellen *P.-falciparum*-Blutstadien (Gametozyten, Gameten, Zygoten) können relativ leicht *in vitro* kultiviert werden. Trager und Jensen beschrieben im Jahre 1976 erstmals die kontinuierliche *In-vitro*-Kultivierung von *P.-falciparum*-Blutstadien und Ifideba und Vanderberg (1981) modifizierten sie. Die Züchtung der mückenspezifischen *P.-falciparum*-Stadien (Ookineten, Oozysten und Sporozoiten) ist jedoch in Deutschland nur in einem Insektarium der Stufe S3\*\* möglich, wie es kurz vor Fertigstellung der vorliegenden Arbeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie etabliert wurde. Die unten angeführte Kultivierung der *P.-falciparum*-Blutstadien konnte daher im eigenen Labor durchgeführt werden. Die Isolation und Fixierung von Ookinetenproben für die Immunfluoreszenzstudien wurde hingegen von Herrn Dipl. Biol. Roland Frank am Imperial College (London), welches ein entsprechendes Insektarium besitzt, durchgeführt.

#### a) Kultivierung asexueller *P.-falciparum*-Blutstadien

Zur kontinuierlichen Kultivierung von asexuellen *P.-falciparum*-Parasiten wurden 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 5 ml, auf 37 °C vorgewärmtes, Zellkulturmedium mit humanen Erythrozyten (Blutgruppe A, Rhesusfaktor positiv, 5% Hämatokrit) versehen und anschließend 10% einer infizierten Kultur zugegeben. Der Medienwechsel erfolgte täglich durch Absaugen des Überstandes oberhalb der sedimentierten, infizierten Erythrozyten und Zugabe von 5 ml frischem, ebenfalls vorgewärmten, Zellkultur-

medium. Nach jeder Passage oder Probenentnahme wurde die Kultur mit 5% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub> für zehn Sekunden begast. Um Dichtestress und eine daraus resultierende Wachstumshemmung sowie eine Gametozytenbildung zu vermeiden, sollte die Dichte der Parasiten 2% nicht übersteigen. Die Parasitämie wurde mit Hilfe von Giemsa gefärbten Blutaussstrichen ermittelt (siehe Kapitel 2.2.1.5). Bei einer Parasitämie von 2% oder höher wurde die kontinuierliche Kultur im Verhältnis 1:10 gesplittet, indem 0,5 ml der Kultur in eine neue Zellkulturflasche überführt wurde und, wie oben beschrieben, mit Medium und Erythrozyten versehen wurde. Die restliche Kultur konnte für die Herstellung von Gametozyten verwendet werden. Zur Konstanthaltung der Temperatur wurden die Kulturflaschen bei den Arbeiten unter der Sterilbank auf eine 37 °C temperierte Wärmeplatte gelegt. Sämtliche *P.-falciparum*-Blutkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C verwahrt.

#### b) Kultivierung sexueller *P.-falciparum*-Stadien

Gametozyten, Gameten und Zygoten sind diejenigen sexuellen Blutstadien von *P. falciparum*, die *in vitro* kultiviert werden können. Zur Erzeugung von Gametozyten wurden 2-3 ml asexuelle Parasiten einer NF54-WT-Kultur, bei einer Ausgangsparasitämie von 2%, in eine 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und 20 ml Zellkulturmedium sowie Erythrozyten (Blutgruppe A, Rhesusfaktor positiv, 5% Hämatokrit) zugegeben. Täglich wurde das verbrauchte Medium durch 20 ml frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt. Die Gametozytenkulturen wurden nach dem Medienwechsel für 20 Sekunden mit 5% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub> begast. Die Gametozytenbildung wurde mittels Giemsa gefärbten Blutaussstrichen kontrolliert (siehe Kapitel 2.2.1.5). Innerhalb von ca. 20 Tagen bildeten sich in der Regel Gametozyten aus, die sich überwiegend in Stadium V befanden. Mit Hilfe von Exflagellationstests konnte der Reifegrad überprüft werden (siehe Kapitel 2.2.1.6). Zum Erhalt von Gameten bzw. Zygoten wurden reife Gametozyten mit A+-Serum unter Zugabe von 0,1 mM Xanthurensäure in 1 x PBS (pH 7,4) aktiviert und für 30 Minuten bzw. für 20 Stunden inkubiert. Die so gewonnenen Gameten bzw. Zygoten konnten entweder direkt für Immunfluoreszenzstudien und elektronenmikroskopische Analysen verwendet werden, oder sie wurden für Western-Blot-Analysen bzw. Interaktionsstudien aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.7, 2.2.1.9, 2.2.1.10, 2.2.3.5 und 2.2.3.6).

#### c) Synchronisierung von asexuellen *P.-falciparum*-Stadien

*P. falciparum* ist der einzige humanpathogene Malariaerreger, dessen Entwicklung asexueller Blutstadien asynchron verläuft. Sowohl für stadienspezifische Expressionsanalysen an *P.-falciparum*-NF54-Parasiten als auch für das Testen der im SFB 630 synthetisierten Inhibitoren an *P.-falciparum*-3D7-Parasiten war jedoch die Verwendung

synchronisierter Kulturen unerlässlich. Durch osmotischen Schock mittels Sorbitol ist es möglich, späte Schizonten abzutöten. Bei wiederholter Inkubation einer asynchronen Kultur mit Sorbitol werden ebenfalls nachreifende Schizonten abgetötet und die frisch synchronisierte Kultur enthält anschließend fast nur noch Ring- bzw. Trophozoitenstadien. Durch Kultivierung in AlbuMax™II-Medium, welches anstelle von humanem A+-Serum bovines Serum enthält, kann eine unerwünschte Bildung von Gametozyten durch Dichtestress in der nun synchron wachsenden Kultur verhindert werden.

Für die Synchronisierung wurde eine kontinuierliche, asexuelle Kultur, welche sich zu ca. 60% im Ring- bzw. Trophozoitenstadium befand, in ein 15-ml-Probenröhrchen überführt, bei 1300 x g für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in dem fünffachen Volumen einer 5%igen, 37 °C warmen, Sorbitol-Lösung resuspendiert und für zehn Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Kultur erneut abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 5 ml AlbuMax™II-Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die frisch synchronisierte Kultur wurde für zehn Sekunden mit 5% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>, wie oben beschrieben, begast und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Synchronisierung wurde nach vier Stunden wiederholt und anschließend wurden 100 µl frische Erythrozyten zugegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Wiederholung dieses Synchronisierungsvorganges. Die synchronisierte kontinuierliche Kultur diente dann entweder als Stammkultur für die Gewinnung von Trophozoiten und Schizonten für Expressionsanalysen (siehe Kapitel 2.2.1.9, 2.2.1.10 und 2.2.3.5), oder für den Viabilitätstest der Inhibitoren im Mikrodilutionsverfahren mittels Malstat-Assay (siehe Kapitel 2.2.3.8).

#### d) Kultivierung mückenspezifischer Stadien von *P. falciparum*

Zur Gewinnung von *P.-falciparum*-Ookineten sowie der anderen mückenspezifischen Stadien (Oozysten und Sporozoiten) müssen reife Gametozyten mittels Membranfütterungen weiblichen *Anopheles-stephensi*-Mücken bei der Blutmahlzeit angeboten werden. Hierfür wurden NF45-Gametozyten - wie oben beschrieben – kultiviert, bis sie überwiegend das Stadium V erreicht hatten, und auf Exflagellation getestet. Jeweils 20 ml einer reifen, exflagellierenden Kultur wurden dann fünf Minuten bei 500 x g und 37 °C abzentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden im Volumenverhältnis von 1:1 in vorgewärmten Erythrozyten der Blutgruppe A+ resuspendiert. Die Erythrozyten waren vor Verwendung mit humanem Serum der Blutgruppe A+ auf einen Hämatokritwert von 50% eingestellt worden.

Einen Tag vor der Blutmahlzeit wurden vier bis fünf Tage alte *Anopheles-stephensi*-Mücken (Stamm SDA500; ca. 60 Stück) in einen 250-ml-Pappbecher, der mit einem

feinen Gazenetz verschlossen wurde, überführt. Die resuspendierten Gametozyten wurden sodann mit Hilfe einer auf das Gazenetz aufgesetzten Saugvorrichtung, die mit 37 °C warmen Wasser temperiert wurde, an die Mücken verfüttert (Abb. 2.7 A).

Den verwendeten *Anopheles-stephensi*-Mücken wurde zuvor 24 Stunden lang die Nahrung entzogen. Nach Abschluß der 20-minütigen Blutmahlzeit wurden die Mücken für 24 Stunden bei 26 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 80% inkubiert sowie täglich mit einer 8%igen Fructose-Lösung gefüttert. Anschließend wurden die Mücken mit CO<sub>2</sub> betäubt, zum Abtöten fünf Minuten in 70%igem Ethanol eingelegt und in 1 x PBS gewaschen. Die Mitteldärme wurden nachfolgend unter dem Binokular freipräpariert. Für die Isolation des Mitteldarms aus einer Mücke wurde diese am Thorax mit einer Uhrmacherpinzette fixiert und mit einer zweiten am fünften Glied des Abdomen vorsichtig gezogen, bis sich das Abdomen vom Thorax löste (Abb. 2.7 B). Jeweils ein freigelegter Mitteldarm wurde der Länge nach auf einem Objektträger ausgestrichen und für die Analyse mittels Immunfluoreszenz zehn Minuten in Methanol fixiert. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Präparate bei 4 °C gelagert.

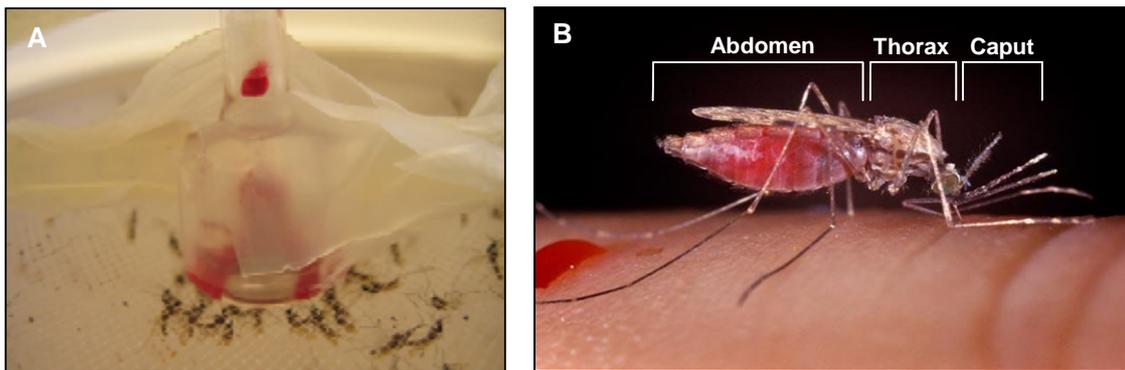


Abb. 2.7. A. Membranfütterung von *Anopheles stephensi* Mücken mittels einer Saugglocke. Quelle: Prof. Ph. D. T. J. Templeton. B. Nomenklatur der Körperabschnitte einer *Anopheles*-Mücke. Quelle: [www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org), verändert.

#### e) Konservierung von *P.-falciparum*-Blutkulturen

Mit Hilfe der Kryokonservierung bei -80 °C können *P.-falciparum*-Blutkulturen für Monate bis Jahre haltbar gemacht werden. Voraussetzung für ein erfolgreiches Wiederauftauen und eine Neuanzüchtung eingefrorener *P.-falciparum*-Blutkulturen ist die ausschließliche Verwendung von infizierten Kulturen, welche sich zum überwiegenden Teil im Ringstadium befinden. Für die Konservierung wurde eine 5-ml-Kultur in ein 15-ml-Probenröhrchen überführt, fünf Minuten bei 1300 x g abzentrifugiert und das Zellpellet anschließend mit dem fünffachen Volumen der Einfrierlösung (Glycerolyte 57) resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT in einem Kryogefäß erfolgte das langsame Einfrieren in einer Styropor-Box bei -80 °C.

#### f) Auftauen von *P.-falciparum*-Blutkulturen

Beim Auftauen von gefrorenen *P.-falciparum*-Kulturen muss eine vorsichtige Angleichung des Salzgehalts vom Hochsalzniveau der Glycerolyte-57-Lösung an die blutphysiologischen Bedingungen mit einem niedrigen Salzgehalt stattfinden. Hierfür wurde die eingefrorene Blutkultur auf Eis aufgetaut, in ein 15-ml-Probenröhrchen überführt und tropfenweise mit 200 µl einer 12%igen NaCl-Lösung versetzt. Nach zweiminütiger Inkubationszeit bei RT wurden 10 ml 1,6%ige NaCl-Lösung ebenfalls tropfenweise zugegeben und die Suspension fünf Minuten bei 1300 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet sanft in 10 ml 0,2% Dextrose/0,9% NaCl resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 5 ml vorgewärmten Zellkulturmedium resuspendiert und in eine 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit 500 µl Erythrozyten (Blutgruppe A, Rhesusfaktor positiv, 5% Hämatokrit) überführt. Die nachfolgende Kultivierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.1.5 Bestimmung der Parasitämie mittels Giemsa-Färbung

Zur Kontrolle der Parasitendichte in einer kontinuierlichen Blutkultur wurde alle drei bis vier Tage ein dünner Blutausstrich angefertigt, mittels einer Giemsa-Lösung gefärbt und mikroskopisch betrachtet (Abb. 2.8). Bei der nach Gustav Giemsa benannten Färbemethode erscheinen die Zellkerne von Protozoen purpurrot und das Zytoplasma der Parasiten erscheint bläulich.

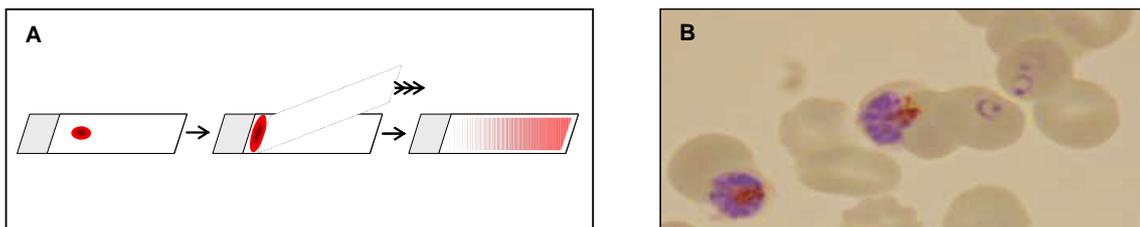


Abb. 2.8. Blutausstrich. A. Anfertigung eines dünnen Blutausstrichs B. Giemsa gefärbter Ausstrich mit Ring- und Schizonten-Stadien von *P.-falciparum*.

Zur Anfertigung eines dünnen Blutausstriches wurden 500 µl einer Parasitenkultur eine Minute lang bei 3400 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf das zweifache Pelletvolumen entfernt, und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Nach Auftragung von 15 µl Zellsuspension auf einen Objektträger wurde mit Hilfe eines zweiten Objektträgers der Tropfen dünn ausgestrichen (Abb. 2.8), an der Luft getrocknet und zur Fixierung mit Methanol ab gespült. Nach erneuter Trocknung wurde der Objektträger einer zehnmütigen Färbung in Giemsa-Lösung (1:25 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

verdünnt) unterzogen. Überschüssige Giemsa-Lösung wurde nachfolgend mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  entfernt und der Ausstrich getrocknet. Die Zelldichte wurde lichtmikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung bestimmt. Zur Bestimmung der Parasitämie der für den Viabilitätstest vorgesehenen Stammkultur wurden acht Gesichtsfelder des entsprechenden Ausstriches ausgezählt. Dazu wurde die Anzahl der befallenen Erythrozyten pro 100 Erythrozyten bestimmt und der Mittelwert gebildet. Die Gametozytenreifung wurde ab dem zehnten Tag nach Ansetzen einer Kultur alle zwei Tage mittels Ausstrich überwacht. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Aufnahmen der fünf Reifestadien von Gametozyten (siehe Kapitel 1.2.2.) wurden unter Benutzung eines Axiophot-Mikroskops und einer AxioCam-Kamera angefertigt.

### 2.2.1.6 Exflagellationstests

Neben dem Blutausrich wurden zur Überprüfung der Gametozytenreifung Exflagellationstests zu Hilfe gezogen. Für den Test auf Exflagellation wurden 300  $\mu\text{l}$  einer Gametozytenkultur des Stadiums V eine Minute bei 3400 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 20  $\mu\text{l}$  humanem A+-Serum versetzt mit 0,1 mM Xanthurensäure in 1 x PBS (pH 7,4) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden 10  $\mu\text{l}$  der Suspension auf einen Objektträger getropft, mit einem Deckgläschen abgedeckt und bei 400-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch betrachtet. Konnten mindestens drei Exflagellationskomplexe pro Gesichtsfeld beobachtet werden, hatten die Gametozyten einen zufriedenstellenden Reifegrad erreicht und wurden für weiterführende Western-Blot-Analysen (siehe Kapitel 2.2.3.5) sowie Interaktionsstudien (siehe Kapitel 2.2.3.6) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.7) oder wurden inaktiviert bzw. aktiviert für Immunfluoreszenzstudien (siehe Kapitel 2.2.1.9) verwendet.

### 2.2.1.7 Aufreinigung von *P.-falciparum*-Blutstadien

#### a) Aufreinigung asexueller Blutstadien

Die Aufreinigung von gemischten asexuellen Stadien erfolgte durch fünfminütiges Zentrifugieren einer 5-ml-Parasitenkultur und einer mindestens 5%igen Parasitämie bei 1300 x g. Nach Resuspendierung des Pellets in 1 ml 1 x PBS, unter Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  einer 10%igen Saponinlösung, wurde die Zellsuspension für 30 Sekunden gemischt und fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 4.000 x g wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 1 x PBS gewaschen. Für die Gewinnung von genomischer DNA (siehe Kapitel 2.2.2.11) wurde das Pellet in 200  $\mu\text{l}$

1 x PBS aufgenommen und mit dem *QIAamp Blood Mini Kit*, (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

Zur Herstellung von Lysaten von synchronisierten Trophozoiten bzw. Schizonten wurden 20 ml Kultur analog zum oben beschriebenen Protokoll abzentrifugiert, im zweifachen Pelletvolumen 1 x PBS und 100-150 µl einer 10%igen Saponinlösung inkubiert und anschließend gewaschen. Das Pellet wurde für Western-Blot-Analysen in 100-200 µl 1 x PBS aufgenommen und mit dem gleichen Volumen 2 x Probenpuffer, versetzt mit 1 M DTT im Verhältnis 1:40, gemischt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Proteinproben bei -20 °C gelagert. Für die Isolation von mRNA erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 1 ml TRIZOL sowie die anschließende sofortige weitere Verarbeitung.

#### b) Aufreinigung von Gametozyten

Die Isolierung von Gametozyten erfolgte mit Hilfe eines von Kariuki *et al.* (1998) beschriebenen Percoll®-Dichtegradienten. Dafür wurden 80-, 65-, 50- und 35%ige Percoll®-Lösungen in RPMI-*incomplete*-Medium hergestellt. Beginnend mit der höchsten Konzentration wurden 2 ml von jedem Gradienten in einem 15-ml-Probenröhrchen vorsichtig überschichtet. Anschließend wurden zwei Gametozytenkulturen bei 2000 x g für fünf Minuten und 37 °C abzentrifugiert und in 2 ml RPMI-*incomplete*-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann langsam auf den Gradienten gegeben und zehn Minuten bei 1500 x g und 37 °C zentrifugiert. Die Gametozyten, welche sich in der Interphase zwischen dem 35- und dem 50%igem Percoll® angereichert haben (Abb. 2.9), wurden vorsichtig abgenommen und in ein neues 15-ml-Probenröhrchen überführt. Es folgten zwei Waschschrirte mit auf 37 °C vorgewärmtem RPMI-*incomplete*-Medium bei 2000 x g für fünf Minuten und 37 °C.

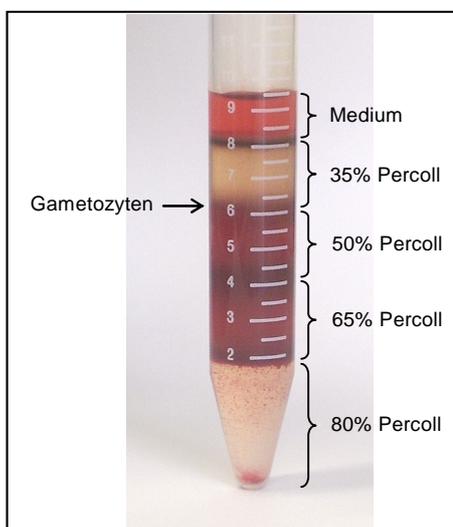


Abb. 2.9. Percoll®-Dichtegradient nach Auftrennung einer *P.-falciparum*-Blutkultur. Die Gametozyten befinden sich in der Interphase zwischen der 35- und der 50%igen Percoll®-Lösung. Quelle: A. Kühn, verändert.

Für die weitere Verwendung des Pellets in Ko-Immunpräzipitationen erfolgte die Aufnahme in 50-150  $\mu$ l PBS-Mix. Für Western-Blot-Analysen wurde das Pellet in 100-200  $\mu$ l 1 x PBS und im gleichen Volumen 2 x Probenpuffer, versetzt mit 1 M DTT im Verhältnis 1:40, aufgenommen. Die Dichte der aufgereinigten Gametozyten konnte durch Giemsa-Färbung eines Ausstrichs des Lysats (ca. 2  $\mu$ l) überprüft werden. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Gametozytenlysate bei -20 °C gelagert. Zur Isolation von mRNA wurde das Pellet anschließend sofort in 1 ml TRIZOL gelöst und weiter verarbeitet.

### c) Aufreinigung von Gameten und Zygoten

Die Aufreinigung von Gameten und Zygoten erfolgte durch Dichtezentrifugation entlang eines Accudenz™-Gradienten. Für die Herstellung des Gradienten wurde eine 6%ige und eine 11%ige Accudenz™-Lösung in vorgewärmtem RPMI-*incomplete* angefertigt und die 6%ige Lösung in ein 50-ml-Probenröhrchen überführt. Die 11%ige Lösung wurde nun sehr langsam und vorsichtig unter die 6%ige Accudenz™-Lösung unterschichtet (Abb. 2.10). Für den Erhalt von Gameten und Zygoten wurde der Inhalt von zwei 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit reifen Gametozyten fünf Minuten bei 1300 x g und 37 °C abzentrifugiert und das Pellet in 3 ml A+-Serum mit 0,1 mM Xanthurensäure in 1 x PBS (pH 7,4) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann, nach vorheriger mikroskopischer Überprüfung der Exflagellation, 30 Minuten (für die Gewinnung von Gametozyten) bzw. 20 Stunden (für die Gewinnung von Zygoten) bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf den Gradienten geschichtet, zehn Minuten bei 3400 x g und 37 °C zentrifugiert. Die Gameten bzw. Zygoten, welche sich in der Interphase der Gradienten angereichert haben (Abb. 2.10), wurden in ein neues 50-ml-Probenröhrchen überführt.

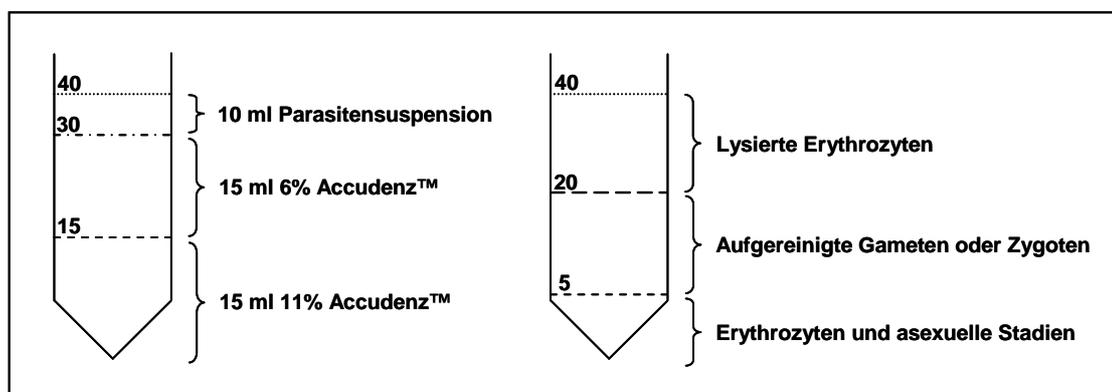


Abb. 2.10. Schema eines Accudenz™-Gradienten zur Aufreinigung von Gameten und Zygoten vor (links) und nach (rechts) Dichtezentrifugation.

Im Anschluss folgte ein fünfminütiger Waschschritt RPMI-*incomplete* bei 1300 x g. Nach Abnahme des Überstandes konnte die Reinheit und Anzahl der Gameten oder Zygoten im Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung kontrolliert werden. Für Western-Blot-Analysen und die Isolation von mRNA wurde das Pellet, wie oben beschrieben, weiterbehandelt.

### 2.2.1.8 Transfektion von *P.-falciparum*-Blutstadien

Eine wichtige Methode zur Funktionsanalyse von Proteinen in *P.-falciparum*-Blutstadien ist die Ausschaltung des entsprechenden Gens mit Hilfe von homologer *single-crossover*-Rekombination. Hierfür werden Erythrozyten mit einem zuvor in einen bakteriellen Vektor klonierten KO-Konstrukt transfiziert. Im Anschluss wird eine asexuelle *P.-falciparum*-Blutkultur, welche sich zu mindestens 70% im Ringstadium befindet, zugegeben. Nach Aufnahme des Vektors in die Parasitenzelle findet durch homologe Rekombination des WT-Locus mit dem KO-Konstrukt die Spaltung des Gens in zwei Hälften statt. Der so entstandene pseudo-diploide Locus sowie die zusätzliche Einführung eines Stopcodons (TAA) verhindert ein korrektes Ablesen des Gens und somit die funktionelle Expression des daraus resultierenden Proteins. Der von den Parasiten aufgenommene Vektor mit Resistenzkassette ermöglicht eine Selektion mit dem entsprechenden Selektionsmarker. Für die Herstellung von *PfCCp5*- bzw. *PfFNPA*-KO-Mutanten durch Integration eines KO-Konstrukts mittels homologer *single-crossover*-Rekombination wurde zunächst das pDT-*Tg23*-Plasmid verwendet (siehe Kapitel 2.1.8.). Das Grundprinzip der Herstellung von pDT-*Tg23*-basierten KO-Mutanten ist in Abb. 2.11 dargestellt.

Da eine Ausschaltung der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Loci mit Hilfe von pDT-*Tg23*-basierten KO-Konstrukten nicht möglich war bzw. die Annahme bestand, dass *PfCCp5* und *PfFNPA* essentiell für die Vollendung des Lebenszyklus von *P. falciparum* sein könnten, wurde zu einem späteren Zeitpunkt der hier vorliegenden Arbeit eine weitere Strategie zur Herstellung von KO-Mutanten gewählt. Dazu wurden ca. 500 bp große Fragmente aus dem vorderen Abschnitt der translatierten 5'-Region des *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Gens in den pCAM-BSD-KO-Vektor kloniert (Abb. 2.12, *PfCCp5*-BSD-KO1 und *PfFNPA*-BSD-KO1) und anschließend in NF54-WT-Parasiten transfiziert. Dieser Vektor besitzt eine Blastocidin-Resistenzkassette (BSD). Durch Integration dieser Konstrukte mittels homologer Rekombination in die 5'-Region des WT-Locus des Zielgens wird eine funktionelle Expression des daraus resultierenden Proteins vollständig unterbunden.

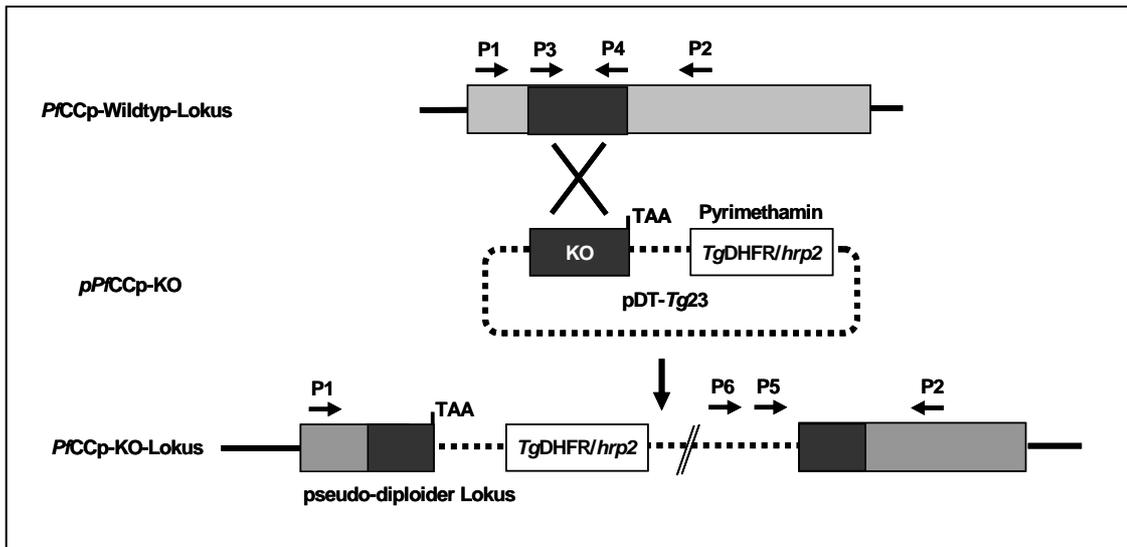


Abb. 2.11. Schema zur Herstellung von *PfCCp*-KO-Parasiten unter Verwendung des pDT-*Tg23*-Vektors und der relativen Position der verwendeten Primer. Durch Rekombination des WT-Locus mit dem KO-Konstrukt an der homologen Region (dunkelgrau) wird der *PfCCp*-Locus (hellgrau) gespalten und eine pseudo-diploide Genanordnung entsteht, welche eine Pyrimethamin-Resistenzkassette und ein eingeführtes Stopcodon (TAA) besitzt. Die Oligonukleotide P1, P2, P5 und P6 dienen zur Überprüfung der Integration mittels diagnostischer PCR, P3 und P4 der Amplifikation des KO-Konstrukts. Quelle: Pradel *et al.*, 2004, verändert.

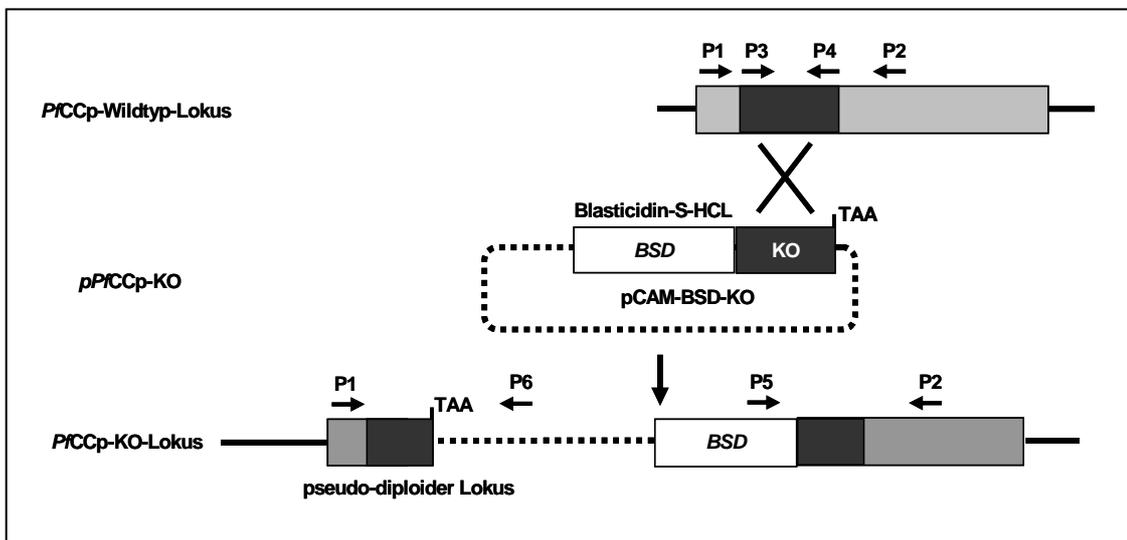


Abb. 2.12. Schema zur Herstellung von *PfCCp*-KO-Parasiten unter Verwendung des pCAM-BSD-KO-Vektors und der relativen Position der verwendeten Primer. Dargestellt ist der durch homologe Rekombination gesplattene WT-Locus (hellgrau) mit dem KO-Konstrukt (dunkelgrau), der Blastocidin-Resistenzkassette und eingeführtem Stopcodon (TAA). Die Oligonukleotide P1, P2, P5 und P6 dienen zur Überprüfung der Integration mittels daignostischer PCR, P3 und P4 der Amplifikation des KO-Konstrukts. Quelle: Dorin-Semblat *et al.*, 2007, verändert.

Nach der Transfektion mit dem *PfFNPA*-BSD-KO1-Konstrukt, welches bei Integration eine vollständige Ausschaltung des WT-Locus von *PfFNPA* zur Folge hat, und erfolgter positiver Selektion, waren jedoch in der Kultur keine viablen Parasiten zu detektieren. Um zu überprüfen, ob eine verkürzte Form des *PfFNPA*-Proteins ebenfalls zu einem Absterben der transfizierten Parasiten führt, wurde zusätzlich ein weiteres, ca. 500 bp großes, Fragment aus dem mittleren Abschnitt der translatierten 5'-Region des *PfFNPA*-Gens, wie oben beschrieben, in den pCAM-BSD-KO-Vektor kloniert und anschließend in NF54-WT-Parasiten transfiziert. Dieses *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukt integriert im Falle einer homologen Rekombination domänenüberspannend in der 3'-Region der FN2- und der 5'-Region der Anth-Domäne von *PfFNPA*, sodass noch eine verkürzte 5'-Region der FN2-Domäne des Proteins exprimiert werden sollte. Darüber hinaus wurde überprüft, ob die *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Loci prinzipiell für genetische Manipulationen zugänglich sind. Hierzu wurden in einem Parallelansatz Fragmente (Größe ca. 500 bp) aus dem 3'-Ende der translatierten Region beider Gene in den pCAM-BSD-Comp-Vektor kloniert und in NF54-WT-Parasiten transfiziert (Abb. 2.13). Der pCAM-BSD-Comp-Vektor besitzt ebenfalls eine Blasticidin-Resistenzkassette. Im Falle einer Integration der Konstrukte wird allerdings die Funktionsfähigkeit der Gene vollständig erhalten und die korrekte Expression kann mittels eines spezifisch gegen das HA-Tag gerichteten Antikörpers analysiert werden.

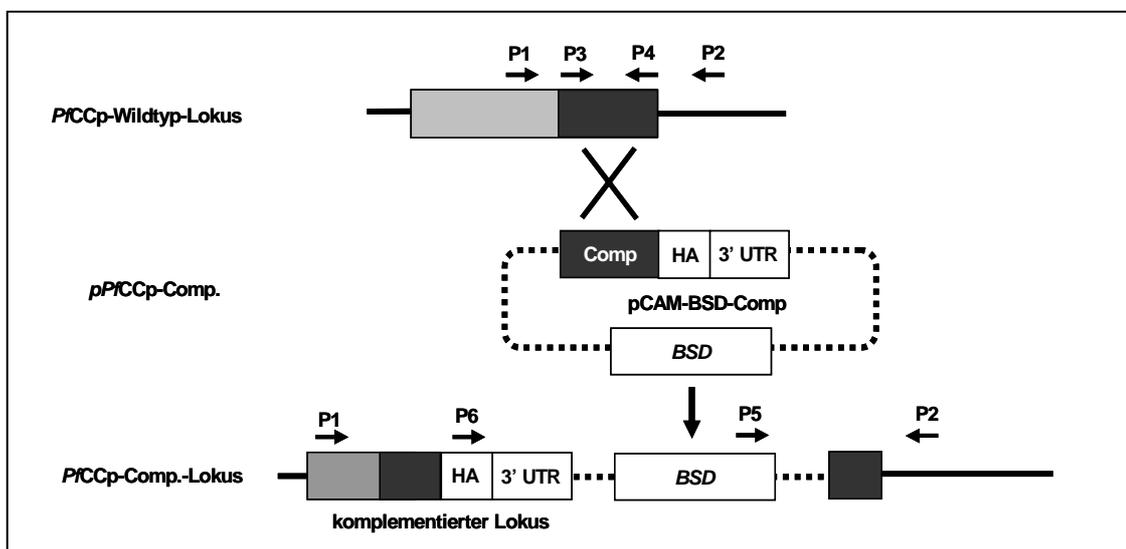


Abb. 2.13. Schema zur Herstellung von *PfCCp*-Comp-Parasiten unter Verwendung des pCAM-BSD-Comp-Vektors. Dargestellt ist der durch homologe Rekombination komplementierte WT-Locus (hellgrau) mit dem Comp-Konstrukt (dunkelgrau), dem HA-Tag gefolgt von der 3' UTR des *P. berghei dhfr-ts*-Gens und der Blasticidin-Resistenzkassette. Die Oligonukleotide P1, P2, P5 und P6 dienten zur Überprüfung der Integration mittels diagnostischer PCR, P3 und P4 der Amplifikation des Comp-Konstrukts. Quelle: Dorin-Semblat et al., 2007, verändert.

Sämtliche in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transfektionen zur Herstellung rekombinanter *P.-falciparum*-Stämme wurden nach der von Deitsch *et al.* (2001) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Transfektion der in den pDT-Tg23-Vektor klonierten PfCCp5- bzw. PfFNPA-KO-Konstrukte (PfCCp5-KO-1 sowie PfFNPA-KO-1 bis PfFNPA-KO-3) wurden in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zweimal 300 µl Erythrozyten (Blutgruppe A+, Rhesusfaktor positiv) jeweils in einem 15-ml-Probenröhrchen fünf Minuten bei 1300 x g zentrifugiert, in 5 ml Cytomix-Puffer resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Nachfolgend wurde jedes Pellet mit 100 µg des jeweiligen KO-Konstrukts (gelöst in 300 µl Cytomix-Puffer) vermischt, in eine sterile 0,2-cm-Elektroporationsküvette überführt und auf Eis gestellt. Bei einer Spannung von 0,31 kV und einer Leistung von 975 µF wurden die Zellen dann elektroporiert. Mittels zweimal 2,5 ml A+-Medium wurden die Zellen von der Küvette gespült, fünf Minuten bei 1300 x g abzentrifugiert und die Pellets wurden in 2,5 ml A+-Medium resuspendiert. Die beiden identischen Ansätze wurden danach in eine 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt sowie mit 500 µl einer asexuellen, kontinuierlichen *P.-falciparum*-NF54-WT-Kultur vermischt, mit 5% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub> für zehn Sekunden begast und bei 37 °C im Brutschrank bis zur nächsten Passagierung inkubiert. Sobald die elektroporierte Blutkultur eine Parasitämie von mindestens 2% erreicht hatte, erfolgte die Wiederholung des oben beschriebenen Vorgangs und 500 µl Parasiten dieser Passage wurden zu frisch elektroporierten Erythrozyten zugegeben. Nach erneutem Erreichen einer Parasitämie von 2% (ca. 3-4 Tage) erfolgte die Umstellung auf A+-Medium mit 0,16 µM Pyrimethamin zur positiven Selektion der TgDHFR-Expression. Die anschließende Isolation genomischer DNA unter Verwendung des *QIAmp Blood Mini Kits* (Qiagen, Hilden) erfolgte 90 Tage nach Beginn der Selektion. Anhand von diagnostischer PCR (siehe Kapitel 2.2.2.2) unter Verwendung der Oligonukleotide T3 bzw. M13 (Abb. 2.11, P5 und P6) und PfCCp5-wt1-Antisense bzw. PfFNPA-wt1-Antisense (P2) wurde auf Integration untersucht. Parallel dazu wurde die Präsenz des PfCCp5- und des PfFNPA-WT-Locus anhand der Oligonukleotide PfCCp5-wt1-Sense bzw. PfFNPA-wt1-Sense oder PfFNPA-wt3-Sense (P1) und PfCCp5-wt1-Antisense bzw. PfFNPA-wt1-Antisense (P2) überprüft. Nicht integrierter episomaler Vektor wurde mit den Oligonukleotiden T3 bzw. M13 (P5) und PfCCp5-KO1-Antisense sowie für die drei unterschiedlichen PfFNPA-KO-Konstrukte mit den Oligonukleotiden PfFNPA-KO1-Antisense, PfFNPA-KO3-Antisense, PfFNPA-KO4-Antisense (P4) nachgewiesen.

Die Transfektionen der in den pCAM-BSD-KO-Vektor klonierten PfCCp5- bzw. PfFNPA-KO-Konstrukte sowie der pCAM-BSD-Comp-Vektor klonierten PfCCp5- bzw. PfFNPA-Comp-Konstrukte wurden jeweils in einem Ansatz wie oben beschrieben

durchgeführt. Jedoch wurden für die Elektroporation frische, aus humanem Vollblut der Blutgruppe A+ (siehe Kapitel 2.1.6), isolierte Erythrozyten verwendet. Des Weiteren wurden 500 µl synchronisierte asexuelle Parasiten einer kontinuierlichen *P. falciparum*-NF54-WT-Kultur, welche sich überwiegend im Ringstadium befand und eine Parasitämie von 5-10% hatte, zu den elektroporierten Erythrozyten zugegeben. Sobald die transfizierten Kulturen sich erneut im Ringstadium befanden, wurde die Elektroporation mit frischen, aus Vollblut gewonnenen Erythrozyten wiederholt und anschließend wurden 500 µl Parasiten aus der entsprechenden ersten Transfektion zugegeben. Aufgrund der hohen Parasitämie wurde das A+-Medium zweimal täglich gewechselt. Nach vier Tagen erfolgte die Umstellung auf A+-Medium mit 2,7 mM Blasticidin S HCL zur positiven Selektion. Eine Woche nach Beginn der positiven Selektion mit Blasticidin S HCL war in den transfizierten Kulturen anhand eines Giemsa gefärbten Blutausstriches kein Parasitenwachstum mehr detektierbar. Weitere 30 Tage später konnte dann jedoch ein erneut reges Parasitenwachstum in den mit dem *PfFNPA*-KO2-Konstrukt und den Comp-Konstrukten transfizierten Kulturen beobachtet werden. Etwa 45 Tage nach Beginn der Selektion erfolgte nach Isolierung genomischer DNA (siehe oben) der Test auf Integration anhand einer diagnostischen PCR. In den mit dem *PfCCp5*-KO1-Konstrukt und dem *PfFNPA*-KO1-Konstrukt (unter Verwendung des pCAM-BSD-KO-Vektors) transfizierten NF54-WT-Kulturen konnte hingegen, wie bereits zuvor erwähnt, nach erfolgter positiver Selektion, auch nach 90 Tagen noch kein erneutes Parasitenwachstum beobachtet werden. Sie wurden daher verworfen. Für den Integrationsnachweis des mittels des pCAM-BSD-KO-Vektor klonierten sowie transfizierten *PfFNPA*-KO2-Konstrukts (*PfFNPA*-BSD-KO2) wurden die Oligonukleotide pCAM-Sense (Abb. 2.12, P5) und *PfFNPA*-wt2-Antisense (P2) sowie die Oligonukleotide pCAM-Antisense2 (P6) und *PfFNPA*-wt4-Sense (P1) verwendet. Parallel dazu wurde die Präsenz des *PfFNPA*-wt-Locus anhand der Oligonukleotide *PfFNPA*-wt4-Sense (P1) und *PfFNPA*-wt2-Antisense (P2) überprüft. Nicht integrierter episomaler Vektor wurde mit den für den pCAM-BSD-KO-Vektor spezifischen Oligonukleotiden pCAM-Sense2 und pCAM-Antisense nachgewiesen.

Für den Integrationsnachweis am 3'-Ende der beiden mittels des pCAM-BSD-Comp-Vektor klonierten sowie transfizierten *PfCCp5*-Comp-Konstrukte (*PfCCp5*-Comp1 und -Comp2) sowie des *PfFNPA*-Comp-Konstrukts (*PfFNPA*-Comp) wurden die Oligonukleotide pCAMcomp-HA-Antisense bzw. pCAMcomp-Antisense (Abb. 2.13; P5 und P6) und *PfCCp5*-wt2-Sense bzw. *PfFNPA*-wt5-Sense (P2) verwendet. Die Präsenz des *PfCCp5* und des *PfFNPA*-WT-Locus wurde anhand der Oligonukleotide *PfCCp5*-wt2-Sense bzw. *PfFNPA*-wt5-Sense (P1) und *PfCCp5*-3'UTR-wt2-Antisense bzw. *PfFNPA*-3'UTR-wt3-Antisense (P2) überprüft. Nicht integrierter episomaler Vektor wurde mit

den für den pCAM-BSD-Comp-Vektor spezifischen Oligonukleotiden pCAMcomp-seq2-*Sense* und pCAMcomp-*Antisense* nachgewiesen.

### 2.2.1.9 Immunfluoreszenzstudien

Der Nachweis von Proteinen und Ihre zelluläre Lokalisation kann mit Hilfe von Fluorochrom gekoppelten Antikörpern anhand einer Immunfluoreszenzanalyse (IFA) erbracht werden. In der direkten Immunfluoreszenz ist dabei der gegen das Antigen gerichtete Primärantikörper selbst an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, während in der indirekten Immunfluoreszenz ein mit einem Fluorochrom gekoppelter Sekundärantikörper mit dem spezifisch an das Antigen bindenden ersten Antikörper interagiert (Abb. 2.14). Das Fluorochrom emittiert bei Anregung einer bestimmten Wellenlänge Licht, das mikroskopisch detektiert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Lokalisations- und Expressionsstudien der *PfCCp5*- sowie *PfFNPA*-Proteine in WT- und *PfCCp1-4* KO-Parasiten wurden ausschließlich mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzanalyse erstellt.

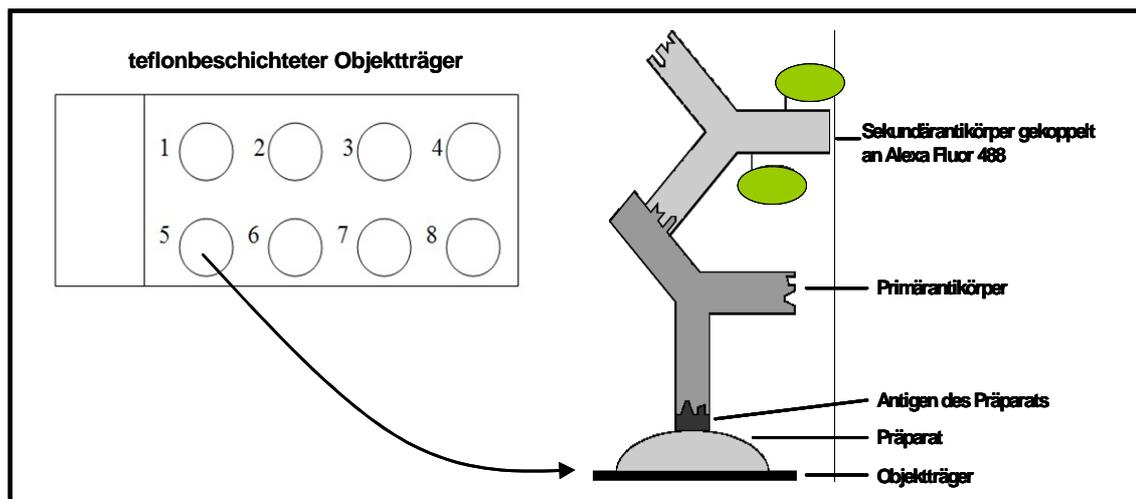


Abb. 2.14. Schematische Darstellung einer Immunfluoreszenz. Das Antigen wird von einem spezifischen Primärantikörper erkannt und an diesen bindet der Sekundärantikörper, welcher mit einem Fluorochrom gekoppelt ist. Das Fluorochrom emittiert, bei Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge Licht. Quelle: Dr. rer. nat. S. M. Scholz, verändert.

Hierfür wurden etwa 300  $\mu$ l einer *Plasmodium-falciparum*-WT- oder KO-Blutkultur, die die gewünschten Stadien enthielt, abgenommen und eine Minute bei 3000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50  $\mu$ l entfernt, das Pellet darin resuspendiert und eine sehr dünne Schicht der Zellsuspension in die Vertiefungen eines teflonbeschichteten Objektträgers pipettiert. Der Objektträger wurde nach Lufttrocknung zehn Minuten in -80 °C kaltem Methanol fixiert und erneut getrocknet.

Der so präparierte Objektträger wurde entweder bis zu seiner Weiterverwendung für maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert oder sofort zur Absättigung unspezifischer Bindestellen zunächst für 30 Minuten in Blockierlösung (0,5% BSA/0,01% Saponin in PBS) auf dem Wippschüttler inkubiert. Es folgte ein weiterer Blockierungsschritt von 30 Minuten bei dem in jede Vertiefung jeweils ein Tropfen Blockierlösung mit 1% neutralem Ziegen Serum (NGS) gegeben wurde. Zur Abdeckung von unspezifischen Bindungsstellen dienen hier neben BSA auch das NGS. Das Saponin verursacht hingegen die Bildung von Poren in der Erythrozytenmembran und der Membran der parasitophoren Vakuole (PVM), wodurch die intrazellulären Parasiten für Antikörper zugänglich werden.

Um ein Trockenfallen der Proben zu verhindern, erfolgten sowohl dieser Blockierungsschritt als auch die Inkubation mit den nachfolgenden Erst- und Zweitantikörpern in einer feuchten Kammer unter Lichtabschluss. Es schloss sich eine Inkubation von eineinhalb Stunden bei 37 °C mit dem gewünschten Primärantikörper an. Zu diesem Zweck wurde der Antikörper in Blockierlösung verdünnt (siehe Kapitel 2.1.11) und 25 µl der Antikörperlösung wurden auf die Probe gegeben. Durch zwei anschließende zehnmündige Waschschriffe mit Blockierlösung auf dem Wippschüttler erfolgte die Entfernung von ungebundenem Antikörper. Anschließend wurde in jede Vertiefung 25 µl des ebenfalls in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörpers gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die eingesetzten Sekundärantikörper waren entweder an Alexa-Fluor-488 (grüne Fluoreszenz) oder an Alexa-Fluor-594 (rote Fluoreszenz) gekoppelt. Nach zwei weiteren Waschschriffen in 1 x PBS für je fünf Minuten erfolgte die Gegenfärbung der Erythrozyten mit einer 0,01%igen *Evans-Blue*-Lösung in 1 x PBS für eine Minute. Bei Verwendung eines mit Alexa-Fluor-594 gekoppelten Sekundärantikörpers wurde dieser Schritt ausgelassen. Das Präparat wurde erneut zweimal zehn Minuten in 1 x PBS gewaschen und nachfolgend schloss sich, zur Färbung des Kernmaterials, eine Inkubation von einer Minute mit *Hoechst Nuclear Stain* an. Das *Hoechst Nuclear Stain* war zuvor in einem Verhältnis von 1:5000 in 1 x PBS verdünnt worden. Nach einem letzten Waschriff auf dem Wippschüttler für fünf Minuten in 1 x PBS wurde in die Vertiefung ein Tropfen Einbettungsmedium gegeben und das Präparat mit Deckgläschen und Nagellack luftdicht verschlossen. Für Doppelmarkierungen erfolgte die Inkubation der beiden Primärantikörper nacheinander. Die beiden Sekundärantikörper wurden nachfolgend gemeinsam (1:1000 in Blockierlösung verdünnt) auf die Probe appliziert.

Neben der Fixierung von Proben in Methanol wurden alternativ auch verschiedene Stadien von *P.-falciparum*-WT-Blutkulturen in Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Diese

Methode ermöglicht einen Erhalt der dreidimensionalen Struktur der Zellen und ist daher besonders gut für Protein-Lokalisationsstudien geeignet. Hierfür wurde 1,5 ml der entsprechenden Parasitenblutkultur eine Minute bei 3000 x g abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in frisch hergestellter 4%iger PFA-Lösung (verdünnt in 1 x PBS) resuspendiert. Zur Fixierung wurde die Zellsuspension über Nacht bei 4 °C und unter sanfter Rotation inkubiert. Die Antikörperinkubation erfolgte danach in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen, analog zum verwendeten Protokoll für die Methanolfixierung. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Probe jeweils für eine Minute bei 3000 x g abzentrifugiert. Für die Kernfärbung wurde hier 30 Minuten mit Toto-3 (1:400 in 1 x PBS verdünnt) inkubiert und anschließend zweimal zehn Minuten mit 1 x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 150-250 µl einer 1%igen Agar-Suspension in 1 x PBS resuspendiert, welche zuvor erhitzt und anschließend auf etwa 50 °C abgekühlt wurde. Eine sehr dünne Schicht der Agar-Zell-Suspension wurde sofort auf die Vertiefungen eines teflonbeschichteten Objektträgers pipettiert und bei 37 °C getrocknet. Falls kein Alexa-Fluor-594-Sekundärantikörper verwendet wurde, erfolgte ebenfalls eine Gegenfärbung mit *Evans Blue*. Schließlich wurden die Präparate, wie oben beschrieben, eingebettet und konnten bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert werden. Die Aufnahmen wurden entweder mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiolab HBO 50/AC mit einer MP 5000 Kamera oder am konfokalen Laserrastermikroskop Zeiss LSM 510 erstellt. Die Nachbearbeitungen der angefertigten Aufnahmen wurde mit dem Adobe® Photoshop CS Programm vorgenommen.

### **2.2.1.10 Transmissionselektronenmikroskopische Studien**

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht die Analyse der Ultrastruktur von Zellen. Bei dieser Methode durchstrahlen Elektronen das Innere einer Probe, welches zu diesem Zweck sehr dünn sein muss, und dienen der Bilderzeugung. Im Gegensatz zu Lichtmikroskopen, deren Auflösungsvermögen auf etwa 200 nm beschränkt ist, haben Elektronenmikroskope eine deutlich höhere Auflösungsgrenze von ca. 1 nm. Die ultrastrukturelle Lokalisation von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Gametozysten wurde durch Immunmarkierung mit einem Sekundärantikörper, der entweder an alkalische Phosphatase (ALP) oder an Goldpartikel (Ø 12 nm) gekoppelt war, untersucht. Nach erfolgter Immunmarkierung wird das Präparat in Epon-Harz eingebettet, um es mit Hilfe eines Ultramikrotoms schneiden zu können. Die notwendigen Arbeitsschritte zur Probenbehandlung teilten sich im Wesentlichen in die drei nachfolgend beschriebenen Abschnitte:

a) Immunmarkierung der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine

Vorbereitend für die Immunmarkierung und anschließende Einbettung in Epon-Harz wurde 1 ml einer reifen WT-Gametozytenkultur in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß eine Minute bei 3000 x g abzentrifugiert, in 4%iger PFA-Lösung resuspendiert und über Nacht bei 4 °C unter Rotation fixiert. Zwischen den nachfolgenden Schritten wurde die Probe immer bei 3000 x g abzentrifugiert und im Anschluss der Überstand entfernt. Alle Wasch-, Inkubations- und Entwässerungsschritte erfolgten unter Rotation. Durch 30-minütiges Waschen in 1 x PBS bei RT wurden Reste der Fixierlösung entfernt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Probe 30 Minuten bei 37 °C mit einer Blockierungslösung (0,5% BSA/0,05% Saponin in 1 x PBS) behandelt, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten in Blockierlösung unter Zugabe von 1% NGS. Für die Immunmarkierung wurde polyklonales *PfCCp5*rp1-Antiserum bzw. *PfFNPA*rp2-Antiserum 1:50 in Blockierlösung verdünnt und die Probe für vier Stunden mit der jeweiligen Antiserum-Verdünnung bei 37 °C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch zwei zehnmündige Waschschrirte in Blockierlösung entfernt, bevor die Probe in dem ALP-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000 in Blockierungslösung verdünnt) resuspendiert und für zwei Stunden ebenfalls bei 37 °C inkubiert wurde. Nachfolgend wurde einmal zehn Minuten in 1 x PBS und einmal zehn Minuten in 1 x TBS gewaschen. Durch Zugabe der ALP-Substratlösung NBT/BCIP erfolgte die Färbung der Probe. Diese Färbereaktion war nach ca. 30 Minuten abgeschlossen und wurde mikroskopisch kontrolliert. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen bedeckt und bei 400-facher Vergrößerung betrachtet. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Probe zweimal zehn Minuten in 1 x TBS, unter Zugabe einer 1%igen 0,5 M EDTA-Lösung, gewaschen. Es folgte eine weitere Fixierung in 4% PFA-Lösung unter Zusatz von 1% Glutaraldehyd über Nacht bei 4 °C.

Nach zwei weiteren 30-minütigen Waschschrirten in 1 x PBS wurden die Zellen in 1%igem Osmiumtetroxid (verdünnt in 1 x PBS) nachfixiert. Nach zweimaliger Spülung in  $H_2O_{\text{bidest}}$  für jeweils eine Minute folgte eine schrittweise Entwässerung der Probe von jeweils zweimal 15 Minuten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (*p. a.*) aus 70%igem, 80%igem, 95%igem sowie 100%igem Ethanol. Sodann wurde die Probe in ein Einbettungsgefäß überführt und zweimal 30 Minuten in 1,2-Epoxypropan bei RT inkubiert, gefolgt von einer einstündigen Equilibrierung in einem 1:1-Gemisch aus Epon-Harz und Epoxypropan. Nach Entfernung des Gemisches wurden die Proben in reinem Epon-Harz über Nacht bei RT inkubiert und schließlich für 48 Stunden bei 60 °C in frischem Epon-Harz auspolymerisiert.

Das Protokoll für die Immunmarkierung mit Goldpartikeln entsprach im Wesentlichen dem der ALP-Immunfärbung, jedoch enthielt die Blockierungslösung im zweiten Absättigungsschritt zur Verbesserung der Permeabilisierung 0,2% Triton-X-100. Weiterhin wurde 5%iges NGS zur Blockierungslösung gegeben. Die Primärantikörper *PfCCp5rp1* sowie *PfFNPArp2* wurden in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt und die Probeninkubation erfolgte hier sechs Stunden bei 37 °C. Der an 12-nm-Goldpartikel gekoppelte Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10 für zwölf Stunden bei 4 °C auf die Probe gegeben. Nachfolgend wurde zweimal zehn Minuten in 1 x PBS gewaschen und anschließend in 4%PFA-Lösung mit 1% Glutaraldehyd über Nacht bei 4 °C fixiert.

#### b) Trimmen und Schneiden der Präparate

Bevor die auspolymerisierte Probe am Ultramikrotom geschnitten werden konnte, musste sie zunächst zurgetrimmt werden. Hierfür wurde die Probe aus dem Einbettungsgefäß entfernt und in einem Probenhalter fixiert. Mit einer Rasierklinge wurde am Binokular zunächst horizontal soviel Epon abgetragen, dass sich die Schnittfläche im Gewebe befand. Danach wurde an den Seiten soviel Material entfernt, dass eine ca. 1-mm<sup>2</sup>-große pyramidenförmige Schnittfläche entstand. Am Ultramikrotom erfolgte unter Verwendung eines Glasmessers die Glättung der so erhaltenen Schnittfläche sowie die anschließende Anfertigung von Semidünnschnitten (grün-violette Lichtbrechung, mit einer Schnittdicke von ca. 0,2 µm; Abb. 2.15).

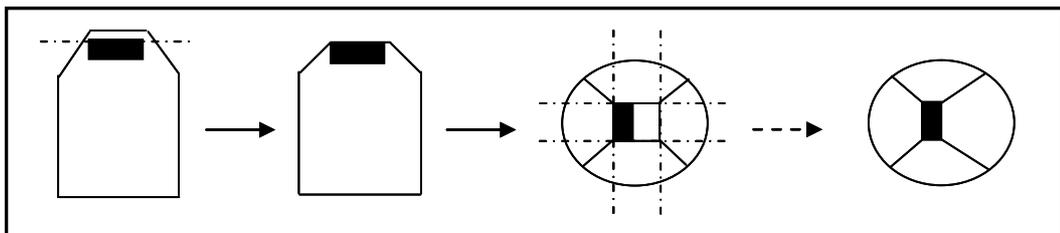


Abb. 2.15. Schema eines Zuschnitts einer in Epon eingebetteten Probe.

Diese wurden mit Hilfe einer an der Spitze zu einer Kugel umgeformten Pasteurpipette auf einen mit einem Wassertropfen versehenen Objektträger transferiert. Durch Verdampfen des überschüssigen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei 60 °C auf eine Heizplatte erfolgte die Fixierung der Schnitte. Nach Färbung mit einem 1:1-Gemisch einer Methylenblau-AzurII-Lösung, erneuter Trocknung auf der Heizplatte und nachfolgendem Spülen mit destilliertem Wasser wurde das Präparat am Lichtmikroskop (400-fache Vergrößerung) untersucht. Waren in dem gefärbten Semidünnschnitt bereits lichtmikroskopisch Zellen erkennbar, wurde das entsprechende Präparat für die Anfertigung von Ultradünnschnitten (silber-goldene Lichtbrechung, mit einer Dicke von ca. 0,05 µm)

verwendet. Nach Streckung der Ultradünnschnitte durch Bedampfung mit Chloroform wurden diese auf Kupfernetzchen (75 mesh Ø 3 mm, beschichtet mit Parlodionfolie) übertragen, luftgetrocknet und in einer Kupfernetzchenbox bei RT gelagert.

### c) Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte

Da biologische Präparate ein geringes Vermögen besitzen, Elektronen zu streuen, mussten die Dünnschnitte vor dem Betrachten im Transmissionselektronenmikroskop durch Anlagerung von Schwermetallatomen auf der Schnittoberfläche nachkontrastiert werden. Dazu wurden die Netzchen mit den Proben zunächst insgesamt dreimal eine Minute mit der nach unten gerichteten Schnittfläche in jeweils einem Tropfen sterilfiltriertem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf einem Streifen Parafilm gewaschen. Die Kontrastierung erfolgte anschließend durch 30-minütige Inkubation in einem Tropfen einer 1%igen Uranylacetat-Lösung in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ . Durch dreimaliges Waschen in jeweils einem Tropfen sterilfiltriertem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  wurde ungebundenes Uranylacetat entfernt. Nach Lufttrocknung der Präparate wurden die Schnitte an einem Zeiss TEM 10 betrachtet und fotografisch dokumentiert. Die erhaltenen Negative wurden mit dem Scanner Perfection 4990 Photo eingescannt und anschließend mit dem Adobe® Photoshop CS Programm bearbeitet.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm kann die Konzentration von Nukleinsäuren spektrophotometrisch bestimmt werden. Anfänglich stand hierfür ein Ultraspec Photometer (Amersham Bioscience, München) zur Verfügung. Die zu messenden Nukleinsäure-Lösungen mussten zur Konzentrationsbestimmung in diesem Photometer verdünnt werden. Mini-Präparation (bspwe. von genomischer DNA) wurden in der Regel 1:40 und Maxi-Präparationen (bspwe. von Plasmiden) 1:80 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  verdünnt. Die Verdünnung von RNA-Präparationen erfolgte hingegen in 10 mM Tris-HCl (pH 7; 1:80). Eine Absorptionseinheit ( $A_{260}$ ) entspricht hierbei entweder 40 µg/ml bei RNA oder 50 µg/ml bei dsDNA. Die Konzentration von Nukleinsäuren kann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors mit diesen Angaben bestimmt werden. Die Ratio aus  $A_{260}/A_{280}$  gibt zudem Aufschluss über Verunreinigungen durch unerwünschte Proteine. DNA ist bei einem Wert von 1,8 und RNA bei einem Wert von 2,0 besonders rein. Zu einem späteren Zeitpunkt der hier vorliegenden Arbeit stand ein Nanodrop™ Photometer

(Peqlab, Erlangen) zur Verfügung, bei dem 1 µl der unverdünnten Nukleinsäure-Lösung direkt auf einen Stempel aufgetragen und gemessen wurde. Die Methode zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration dieses Gerätes basiert auf dem oben beschriebenen Prinzip.

### 2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der von Mullis 1984 entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, eine DNA-Sequenz künstlich in großer Kopienzahl zu vervielfältigen. Das Enzym DNA-Polymerase, welches in allen lebenden Organismen natürlich vorkommt, repliziert dabei in der PCR die angebotene doppelsträngige *template*-DNA. Voraussetzung ist die Kenntnis der Basenabfolge flankierender Sequenzen, um entsprechende - zu den flankierenden Regionen komplementäre - Oligonukleotide entwerfen zu können. Weitere grundlegende Komponenten für eine erfolgreiche DNA-Amplifikation sind: Die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP (A), dGTP (G), dCTP (C) und dTTP (T), eine Pufferlösung und Mg<sup>2+</sup>-Ionen für die DNA-Polymerase sowie ein PCR-Thermocycler. Durch geschicktes Oligonukleotiddesign können darüber hinaus Mutationen verursacht oder Restriktionsschnittstellen in die amplifizierte DNA eingefügt werden.

Ein PCR-Zyklus besteht aus folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung (*Melting*) der doppelsträngigen DNA mittels Erhitzen auf 95 °C
2. Hybridisierung (*Annealing*) der Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA durch rasches Abkühlen auf 48 °C bis 60 °C
3. Amplifikation (*Elongation*) der DNA bei etwa 68 °C bis 72 °C, abhängig vom Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase

Die *Annealing*-Temperatur kann mit der folgenden Formel berechnet werden:

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

Für die Schmelztemperatur gilt:

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

Ausgangspunkt für die Klonierung von rekombinanten Proteinen oder Konstrukten für homologe Rekombination war die Vervielfältigung von ausgewählten Zielsequenzen mittels PCR unter Anfügung von Restriktionsschnittstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden die klonierten rekombinanten Proteine (rp) *PfCCp5rp1*, *PfCCp5rp2*, *PfFNPArp1* und *PfFNPArp2* (Abb. 2.16) unter Berücksichtigung der Domänenstruktur der nativen

Proteine für Interaktionsstudien bzw. zur Antikörperproduktion verwendet. Zur gerichteten Klonierung der rekombinanten Proteine in die Vektoren pSUMO/pSMT3 (6xHis/SUMO-Fusionsprotein) bzw. pGEX-4T-1 (GST-Fusionsprotein, siehe Kapitel 2.1.8) wurde am 5'-Terminus der entsprechenden Oligonukleotide eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Terminus eine *Not*I-Schnittstelle mit nachfolgenden Stopkodon (TAA) eingefügt. Die Konstrukte unter Verwendung des pSUMO/pSMT3-Vektors zur Expression der rekombinanten Proteine *PfCCp5rp2*, *PfFNPArp1* und *PfFNPArp2* wurden bereits von Frau Dr. Gabriele Pradel am WMC New York hergestellt.

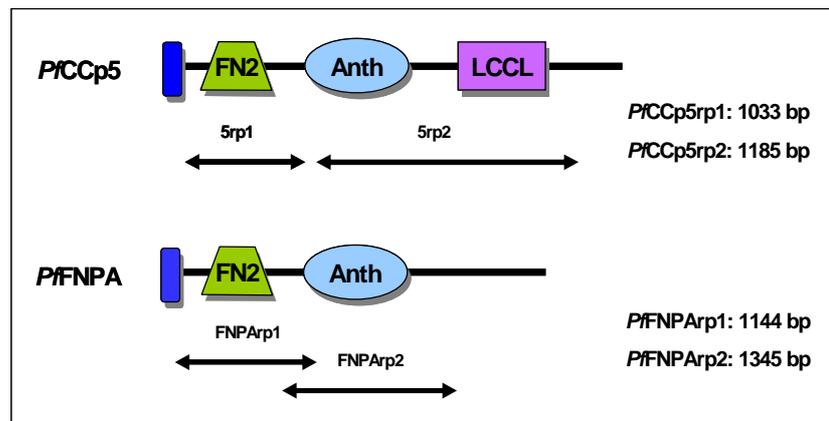


Abb. 2.16. Relative Position und Länge der Genabschnitte zur Klonierung domänen-spezifischer, rekombinanter *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine. Quelle: Dr. phil. nat. G. Pradel, verändert.

Die Konstrukte zur Herstellung von *PfCCp5*- und *PfFNPA*-KO-Mutanten unter Verwendung des pDT-*Tg23* Vektors (Abb. 2.3) tragen am 5'-Terminus eine eingefügte *Sac* II-Schnittstelle und am 3'-Terminus eine *Not*I-Schnittstelle mit nachfolgendem Stopkodon (TAA). Die Konstrukte zur Herstellung von *PfCCp5*- sowie von *PfFNPA*-KO-Mutanten unter Verwendung des pCAM-BSD-KO Vektors (Abb. 2.4) tragen am 5'-Terminus eine eingefügte *Bam*HI-Schnittstelle und am 3'-Terminus ebenfalls eine *Not*I-Schnittstelle gefolgt von einem Stopkodon. Die Konstrukte der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Komplementations-Mutanten auf Basis pCAM-BSD-Comp Vektors (Abb. 2.5) tragen hingegen am 5'-Terminus eine eingefügte *Pst*I-Schnittstelle und am 3'-Terminus eine *Bam*HI-Schnittstelle ohne Stopkodon. Für Klonierungen zu vervielfältigende DNA wurde mit Hilfe der *Pfx*-Polymerase amplifiziert. Dieses Enzym besitzt eine *proof-reading*-Funktion und verhindert so den Einbau von falschen Basen durch fehlerhaftes Ablesen der *template*-DNA. Um ausreichend DNA-Material für die Klonierung von rekombinantem Protein zu erhalten, wurden jeweils fünf identische PCR-Reaktionen angesetzt und anschließend vereinigt.

Der Mix für eine PCR-Reaktion enthält:

10 x Polymerasepuffer	5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	1 $\mu$ l
<i>template</i> -DNA	100 ng
dNTPs (10 mM)	1,5 $\mu$ l
<i>Pfx</i> -Polymerase	0,5 $\mu$ l
Oligonukleotid <i>sense</i> (100 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Oligonukleotid <i>antisense</i> (100 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 $\mu$ l

Die Bedingungen der PCR-Zyklen waren wie folgt:

95 °C	Denaturieren	4 Min.	} 33 Zyklen
95 °C	Denaturieren	30 Sek.	
50 °C	Hybridisierung	30 Sek.	
62 °C	Elongation	1 Min./700 bp	
72 °C	Finale Elongation	3 Min.	
8 °C	Lagerung	$\infty$	

Neben der herkömmlichen PCR zur Amplifikation von Fragmenten für die Herstellung rekombinanter Proteine und für die homologe Rekombination wurden noch zwei weitere PCR-Varianten verwendet:

#### a) Semi-quantitative PCR

Zur Expressionsanalyse des *PfCCp5*- und des *PfFNPA*-Transkripts wurde eine semi-quantitative PCR angewendet. Bei dieser Variante der PCR wird cDNA als *template*-DNA eingesetzt, welche zuvor mit Hilfe des Reverse-Transkriptase-(RT)-Enzyms aus RNA hergestellt wurde (siehe Kapitel 2.2.2.10). Da die semi-quantitative PCR der Expressionsanalyse von Genen auf mRNA-Ebene dient, sollten die Oligonukleotide spezifisch an das gewünschte Gen binden und ein Produkt von ca. 200 bp liefern.

Hierfür wurden 250 ng cDNA (siehe Kapitel 2.2.2.1) der verschiedenen *P.-falciparum*-NF54-WT-Parasitenstadien (Trophozoiten, Schizonten, Gametozyten, Gameten und Zygoten) sowie von *P.-falciparum*-F12-Schizonten in einer PCR-Reaktion mit 35 Zyklen und einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C eingesetzt. Der Mix für eine PCR-Reaktion war wie oben angegeben. Allerdings enthielt er anstatt 0,5  $\mu$ l *Pfx*-Polymerase 0,25  $\mu$ l *GoTaq*<sup>®</sup>-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim), 4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM) anstelle von MgSO<sub>4</sub> sowie nur 1  $\mu$ l dNTPs (10 mM). Die *GoTaq*<sup>®</sup>-DNA-Polymerase ist eine Weiterentwicklung der herkömmlichen *Taq*-Polymerase, welche eine größere

Sensitivität und Spezifität besitzt. Als Kontrollen wurden Oligonukleotidpaare gegen *PfAMA-1*, das in asexuellen Stadien exprimiert wird (Peterson *et al.*, 1989; Narum und Thomas, 1994; Hodder *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1996), gegen *PfCCp1* (Expression in Gametozyten und Makrogameten; Pradel *et al.*, 2004, 2006; Pradel, 2007; Scholz *et al.*, 2008), gegen *Pfs25* (Expression in Makrogameten, Zygoten und Ookineten; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990) sowie gegen *Pfs28*, welches in Zygoten und Ookineten exprimiert wird (Duffy und Kaslow, 1997), verwendet. Zusätzlich wurde genomische DNA als Positivkontrolle (+) und Reaktionen ohne DNA wurden als Negativkontrollen (-) eingesetzt.

#### b) Diagnostische PCR

Für die Analyse der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-KO-Integration auf Basis des pDT-*Tg23* Vektors wurden diagnostische PCRs unter Verwendung einer *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Der verwendete Mix für eine PCR-Reaktion enthielt dabei 1,5 µl  $MgCl_2$  (50 mM) statt 1 µl  $MgSO_4$  und 1 µl anstatt 1,5 µl dNTPs (10 mM). Die eingesetzten diagnostischen Oligonukleotide sind in Abb. 2.11 dargestellt.

Die Analyse der *PfCCp5*- und der *PfFNPA*-KO-Integration auf Basis des pCAM-BSD-KO-Vektors sowie der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Comp-Integration unter Verwendung des pCAM-BSD-Comp-Vektors wurde mit Hilfe der *GoTaq*<sup>®</sup>-DNA-Polymerase durchgeführt. Der Mix für eine PCR-Reaktion enthielt hierbei 0,25 µl *GoTaq*<sup>®</sup>-DNA-Polymerase und 4 µl  $MgCl_2$  (50 mM) sowie nur 1 µl dNTPs (10 mM). Alle anderen Komponenten wurden wie oben angegeben eingesetzt. Die verwendeten diagnostischen Oligonukleotide sind in Abb. 2.12 und Abb. 2.13 dargestellt.

### 2.2.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte für Klonierungen wurden mittels des *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt. Hierzu wurden fünf identische PCR-Reaktionen auf eine Säule gegeben. Die Silikatmembran der Säule bindet die PCR-Fragmente in Anwesenheit von Hochsalzpuffern, während Oligonukleotide, Enzyme und genomische DNA die Säule passieren. Die von Verunreinigungen befreiten Fragmente wurden anschließend mit 50 µl  $H_2O_{bidest}$  von der Säule eluiert.

### 2.2.2.4 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Für eine nachfolgende Ligation der PCR-Fragmente in den gewünschten Vektor müssen sowohl diese als auch das zu verwendende Plasmid mit Hilfe von

Restriktionsendonukleasen verdaut werden. Diese Enzyme erkennen spezifische meist palindromische DNA-Bereiche und spalten doppelsträngige DNA (dsDNA) an diesen Stellen. Die in der vorliegenden Arbeit für die gerichtete Klonierung von PCR-Produkten in Vektoren eingesetzten Restriktionsenzyme stammten von NEB, die verwendeten Puffer stammten hingegen von Invitrogen. Die Schnittstellen für die Klonierung in die Expressionsvektoren pSUMO/pSMT3 und pGEX-4T-1 lauteten *BamH* I und *Not* I. Für die Klonierung in den KO-Vektor pDT-Tg23 wurden die Schnittstellen *Sac* II sowie *Not* I und für den pCAM-BSD-KO Vektor wurden *BamH* I sowie *Not* I benutzt. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCAM-BSD-Comp Vektor wurden die Schnittstellen *BamH* I und *Pst* I verwendet (Abb. 2.17). Durch den Verdau (drei bis vier Stunden; 37 °C) mit den entsprechenden Enzymen entstehen überhängende Enden, welche anschließend leichter ligierbar sind.

<i>Bam</i> HI	<i>Not</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sac</i> II
5'...GAATTC...3'	5'...GGGCGGCCG...3'	5'...CTGCAG...3'	5'...CCGCGG...3'
3'...CTTAAG...5'	3'...CGCGGCCG...5'	3'...GACGTC...5'	3'...GGCGCC...5'

Abb. 2.17. Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen.

Ein Ansatz zum Verdau der DNA-Fragmente sowie der Vektoren pSUMO/pSMT3 bzw. pGEX-4T-1 zur Klonierung rekombinanter Proteine enthielt:

Vektor-DNA	1-2 µl	bzw. aufgereinigte	PCR	43 µl
10 x React 3	5 µl		10 x React 3	5 µl
10 x BSA	5 µl		10 x BSA	5 µl
<i>Bam</i> HI	0,5 µl		<i>Bam</i> HI	0,5 µl
<i>Not</i> I	0,5 µl		<i>Not</i> I	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl		H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl

Für die Klonierung der *Pf*CCp5- sowie *Pf*FNPA-KO-Konstrukte in den pDT-Tg23-Vektor wurde folgender Verdau angesetzt:

DNA	1-2 µg	bzw.aufgereinigte	PCR	43 µl
10 x React 4	5 µl		10 x React 4	5 µl
10 x BSA	5 µl		10 x BSA	5 µl
<i>Sac</i> II	0,5 µl		<i>Sac</i> II	0,5 µl
<i>Not</i> I	0,5 µl		<i>Not</i> I	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl		H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl

Die Ansätze zum Verdau der Vektoren pCAM-BSD-KO bzw. pCAM-BSD-Comp sowie der zugehörigen DNA-Fragmente waren wie oben beschrieben. Jedoch wurden im Falle der Klonierung in den pCAM-BSD-KO Vektor die Enzyme *Bam*HI und *Not*I sowie der Puffer React 3 verwendet bzw. für die Klonierung in den pCAM-BSD-Comp Vektor wurden *Bam*HI und *Pst*I mit dem Puffer React 4 benutzt.

Eine darauf folgende Zugabe von 1 µl CIP-Alkalischer Phosphatase zu den verdauten Vektoren und erneute Inkubation bei 37 °C für eine Stunde spaltete freie Phosphatgruppen an den DNA-Enden ab und verhinderte somit eine unerwünschte Selbstligation. Nach Zufügen von 1/6 Volumen sechsfachem DNA-Probenpuffer erfolgte die Auftrennung sowie die anschließende Aufreinigung der Spaltprodukte des DNA-Verdaus.

### 2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäure-Stränge (RNA oder DNA) anhand ihrer Größe zu trennen sowie ihre Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Infolge der negativen Ladung der Phosphatreste an den Nukleinsäuren bewegen sich diese entsprechend ihrer Größe gerichtet in einem elektrischen Feld. Dabei ist die Geschwindigkeit, mit welcher sich ein Nukleinsäurefragment in der Agarose-Matrix bewegt, umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl seiner Basenpaare. Die Konzentration der Agarose-Gel-Matrix kann hierbei je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 0,3% (Fragmente von 1 bis 30 kb) und 2,0% (Fragmente von 0,1 bis 2 kb) variieren. Durch Anfärben der DNA nach einem Gellauf in einem Ethidiumbromidbad kann diese unter UV-Licht betrachtet werden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und fluoresziert unter UV-Licht. In dieser Arbeit wurde für die Agarose-Gelelektrophorese meist 1,4%ige Agarose verwendet. Für die Auftrennung der cDNA-Fragmente zur Expressionsanalyse nach semi-quantitativer PCR wurde jedoch eine 2%ige Agarose eingesetzt. Hierfür wurde die benötigte Menge Agarose eingewogen und mit 1 x TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde das Agarose-Gemisch luftblasenfrei in einen abgedichteten Gelschlitten gegossen und durch Einsetzen eines Kammes Taschen geformt. Das auspolymerisierte Gel wurde in einer Laufkammer mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die in 1/6 Volumen 6 x Probenpuffer verdünnten Proben wurden in die Taschen gefüllt. Abhängig von der Größe der verwendeten Laufkammer betrug die angelegte Spannung entweder 100 V (MIDI-1-Kammer) oder 200 V (MAXI-Kammer).

Nach Abschluss des Gellaufs erfolgte die Färbung des Gel für 15 Minuten in der Ethidiumbromidlösung (1:10.000 in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ) und die Analyse unter UV-Licht sowie die photographische Dokumentation. Durch Vergleich mit einem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA-Molekularlängenstandard konnte die Größe der aufgetrennten Nucleinsäuren identifiziert werden. Die erhaltenen Bilder wurden mit dem Scanner Perfection 4990 Photo eingescannt und mit dem Adobe® Photoshop CS Programm bearbeitet.

### 2.2.2.6 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung der restriktionsverdauten PCR-Produkte und Vektoren wurde eine präparative Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Hierfür wurden die DNA-Fragmente, wie oben beschrieben, appliziert und aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde dann allerdings nur der Molekulargewichtstandard sowie die erste Proben tasche gefärbt und unter UV-Licht lokalisiert. Anhand des Größenvergleichs mit der gefärbten Probe wurde der gewünschte Bereich der angrenzenden Proben „blind“ ausgeschnitten. Diese Methode sollte eine mögliche Schädigung der DNA durch das interkalierende Ethidiumbromid und UV-Licht-Exposition verhindern, um die nachfolgende Ligation nicht zu stören. Die Reinigung und anschließende Elution der DNA in  $50 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  wurde mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation der PCR-Produkte in den jeweiligen geschnittenen Vektor wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Phosphodiesterbindungen zwischen  $3'$ -Hydroxyl-Gruppen und  $5'$ -Phosphat-Gruppen in doppelsträngiger DNA und verbindet so zwei fremde Nucleinsäurestränge miteinander (Abb. 2.18).

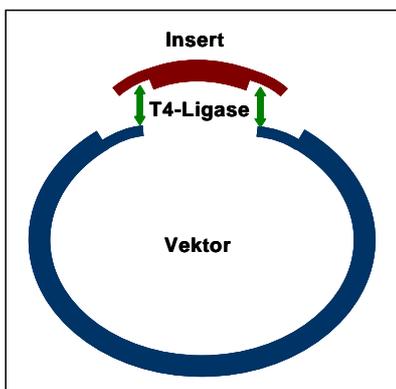


Abb. 2.18. Schematische Darstellung einer Ligation. Die T4-DNA-Ligase verbindet den Vektor mit dem Insert durch Katalyse von Phosphodiesterbindungen zwischen den  $3'$ -Hydroxyl-Gruppen und den  $5'$ -Phosphat-Gruppen doppelsträngiger DNA.

Der Vektor und das PCR-Fragment (Insert) wurden hierfür in einem molaren Verhältnis von 1:5 ligiert. Die zu verwenden Mengen wurden dazu mit der folgenden Formel berechnet:

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

Ein Ligationsansatz enthielt die folgenden Komponenten:

PCR-Fragment	x µl
Vektor	y µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	z µl
10 x Ligasepuffer	2 µl
T4 Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 µl

Die Inkubation erfolgte jeweils über Nacht bei 16 °C. Für die nachfolgende Transformation wurden jeweils 2 µl eines Ligationsansatzes (siehe Kapitel 2.2.1.2) verwendet.

### 2.2.2.8 Replikation und Isolation von Plasmid-DNA

Transformierte *E.-coli-OneShot*<sup>®</sup>-Top10-Bakterien (siehe Kapitel 2.2.1.2) wurden in LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Nach Erreichen der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen und die Plasmid-DNA isoliert. Abhängig vom Verwendungszweck wurden zwei unterschiedliche Isolationsmethoden gewählt: Zur Analyse von Bakterienklonen nach Transformation von Ligationsansätzen wurde eine so genannte *Dirty Mini* zur Plasmidpräparation durchgeführt. Für Sequenzierungen und Transfektion wurde jedoch besonders reine DNA benötigt, weshalb die Plasmide mittels eines Qiagen Mini- oder Maxi-Präparations-Kits über eine Silikatmembran gemäß Herstellerangaben gereinigt und isoliert wurden. Beide Verfahren machen sich die alkalische Lyse (Birnboim und Doley, 1979) mit einer nachfolgenden Isopropanolfällung der DNA zu Nutze. Die Durchführung einer Mini- oder Maxi-Präparation war abhängig von der benötigten Menge des Plasmids. Mit einer Mini-Präparation können aus 3 ml Übernachtskultur (ÜNK) bis zu 20 µg Plasmid-DNA gewonnen werden, mit einer Maxi-Präparation hingegen aus 1000 ml ÜNK bis zu 500 µg Plasmid-DNA. Die Plasmide wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert und bei -20 °C gelagert.

Für eine *Dirty Mini* wurde jeweils ein gewünschter Bakterienklon von einer LB-Agarplatte gepickt und in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Überführung der Bakteriensuspension in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurde eine Minute bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung 1 resuspendiert, bevor 200 µl Lösung 2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt wurde. Zur Lyse der Bakterienzellen wurde zehn Minuten auf Eis inkubiert und mit 150 µl Lösung 3 erfolgte die anschließende Neutralisation. Dafür wurde die Probe erneut invertiert und nochmals zehn Minuten auf Eis gestellt. Um unerwünschte RNA zu präzipitieren, wurden sodann 450 µl LiCl-Lösung (5 M) hinzugefügt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 16.000 x g für 15 Minuten wurde der Überstand in ein sauberes 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Hilfe von Isopropanol gefällt. Hierzu wurde der Überstand mit 0.6 Volumenanteilen Isopropanol gemischt und zehn Minuten bei RT inkubiert. Mittels Zentrifugation für zehn Minuten bei 16.000 x g wurde die DNA pelletiert. Durch nachfolgendes zweimaliges Waschen mit 200 µl 70%igem Ethanol für zehn Minuten bei 16.000 x g wurde das Pellet von Verunreinigungen befreit. Nach Trocknung bei RT erfolgte die Aufnahme des DNA-Pellets in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>.

Für einen Kontrollverdau wurden in einem Endvolumen von 10 µl insgesamt 3 µl DNA aus einer *Dirty Mini* mit 1 µl 10 x Puffer und jeweils 0,5 µl der entsprechenden Restriktionsenzyme mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Ethidiumbromidfärbung konnten die erhaltenen Spaltprodukte unter UV-Licht sichtbar gemacht und beurteilt werden.

### 2.2.2.9 DNA-Sequenzierung

Sämtliche in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Weissbrich am Institut für Virologie der Universität Würzburg mit Hilfe eines ABI Prism<sup>®</sup> 3100 Gerätes erstellt. Sequenzierungen dienten der Überprüfung der korrekten Orientierung und Nukleotidabfolge neu klonierter Konstrukte (siehe Kapitel 2.2.2.7). Vorbereitend wurde eine PCR-Reaktion unter Verwendung des *BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt dabei die folgenden Komponenten:

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

Für die PCR-Reaktion wurden die unten angeführten Bedingungen verwendet:

Denaturieren	95 °C	4 Min.	} 30 Zyklen
Denaturieren	95 °C	30 Sek.	
Hybridisieren	50 °C	30 Sek.	
Elongation	62 °C	4 Min.	
Finale Elongation	72 °C	3 Min.	
Lagerung	8 °C	∞	

Bevor das PCR-Produkt an die Arbeitsgruppe Weissbrich zum Zwecke der Sequenzierung übergeben wurde, erfolgte eine Aufreinigung mittels Ethanol-Fällung. Hierzu wurden zu den 10 µl PCR-Reaktion 90 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, 10 µl NaAc (3 M; pH 4,6) sowie 250 µl 100% Ethanol (p.a.) gegeben und der Ansatz wurde bei 16.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Überstandes wurde mit 70%igem Ethanol durch 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g bei RT gewaschen. Das Pellet wurde nachfolgend getrocknet und in 25 µl Formamid resuspendiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Verwendung der BioEdit Software sowie des NCBI Blast Programms analysiert.

### 2.2.2.10 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Zur Gewinnung von mRNA aus Zellen müssen diese lytisch aufgeschlossen werden und die Gesamt-RNA mit Hilfe von Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Chloroform extrahiert werden. Der Anteil der mRNA einer Zelle beträgt nur ca. 2%, diese Menge ist jedoch für eine Transkriptanalyse mittels RT-PCR ausreichend. Um eine Degradation der RNA zu verhindern, ist sauberes Arbeiten sowie die Inaktivierung von zelleigenen und fremden RNAsen unabdingbar. Aus diesem Grunde wurden alle für die Präparation verwendeten Gefäße doppelt autoklaviert und es wurden nur RNAase-freie Filterspitzen verwendet. Alle Lösungen wurden mit autoklaviertem 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt. Im Wesentlichen waren die Arbeitsgänge bis zur Synthese von cDNA in drei Abschnitte unterteilt:

#### a) Isolation von RNA

Für eine Transkriptionsanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA* wurden die in Kapitel 2.1.7 beschriebenen *P.-falciparum*-NF54-WT- und -F12-Blutstadien kultiviert (siehe Kapitel 2.2.1.4), aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1.7) und jeweils in 1 ml TRIZOL resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei RT wurden 0,2 ml Chloroform hinzugefügt. Die Suspension wurde gemischt, zehn Minuten schüttelnd bei RT inkubiert und 15 Minuten bei 16.000 x g sowie 4 °C zentrifugiert. Die oberste, wässrige

RNA-Phase wurde abgenommen, in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde erneut für zehn Minuten bei RT schüttelnd inkubiert und darauf 15 Minuten bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml eiskaltem 75%igem Ethanol (p. a.; verdünnt mit 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O) durch fünfminütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, die RNA bei RT an der Luft getrocknet und schließlich bei 60 °C zehn Minuten in 20 µl 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

b) DNase-Verdau der RNA-Proben

Mögliche Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA, wurden durch einen 40-minütigen DNA-Verdau bei RT und einer anschließenden Aufreinigung der RNA beseitigt. Für den Verdau wurde folgender Ansatz gewählt:

RNA	2 µg
10 x DNase-Puffer	10 µl
DNase I	2,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (RNase frei)	ad 100 µl

Für die nachfolgende RNA-Aufreinigung wurden 100 µl Ansatz mit 0,25 ml 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O und 0,15 ml Chloroform gemischt, fünf Minuten schüttelnd bei RT inkubiert sowie zehn Minuten bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 0,3 ml Chloroform wurden zugegeben. Die fünf Minuten Inkubation auf dem Schüttler bei RT sowie die 10minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wurden wiederholt und die obere Phase wurde erneut in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 30 µl NaOAC (3 M) sowie 100% EtOH (eiskalt) erfolgte eine 30-minütige Fällung der RNA auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 20 Minuten bei 16.000 x g und 4 °C. Nach einmaligem Waschen mit 75%igem EtOH bei 16.000 x g und 4 °C für zehn Minuten, wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 20 µl 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

## c) cDNA-Synthese

Unter Verwendung des *SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR* wurde im Anschluss die reverse Transkription mit folgenden Komponenten im Doppelansatz durchgeführt:

RNA	10 µl
random hexamers (50 ng/µl)	0,5 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (RNase-frei)	ad 12 µl

Die Ansätze wurden fünf Minuten bei 65 °C und danach eine Minute auf Eis inkubiert, bevor folgende Reagenzien zugefügt wurden:

10 x RT-Puffer	2 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNAse OUT Inhibitor	1 µl

Nach zwei Minuten Inkubation bei 25 °C wurde jeweils zu einer Probe des Doppelansatzes (+) 1 µl *SuperScript™-II-Reverse-Transkriptase* zugegeben. Die zweite Probe, welche als Negativkontrolle (-) diente, wurde hingegen nicht mit Reverser Transkriptase versetzt. Die Ansätze wurden nun zunächst zehn Minuten bei 25 °C und dann 50 Minuten bei 42 °C sowie nachfolgend zur Termination der Reaktion 15 Minuten bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Um untranskribierte RNA abzubauen, wurden die Ansätze, nach kurzer Abkühlung auf Eis, mit 1 µl RNAse H versetzt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die cDNA wurde bis zur Durchführung einer semi-quantitativen PCR (siehe Kapitel 2.2.2.2) bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.11 Isolation genomischer DNA aus *P. falciparum*

Genomische DNA aus asexuellen *P.-falciparum*-Stadien diente zum einen der Verifizierung der *PfCCp5*- und *PfFNPA-KO*- bzw. Komplementations-Parasiten mittels diagnostischer PCR und zum anderen als *template*-DNA für die Klonierung rekombinanter Proteine (siehe Kapitel 2.2.2.7). Sowohl in der diagnostischen PCR als auch in der RT-PCR diente genomische DNA aus asexuellen NF54-WT-Parasiten als Positivkontrolle für die Amplifikation eines Genabschnittes aus dem WT-Locus. Hierzu wurde die genomische DNA der gewünschten Parasitenlinie unter Verwendung des *QIAamp Blood Mini Kit* gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Expression rekombinanter Proteine

Proteinexpressionen erfolgten mit Hilfe des sowohl in den pSUMO/pSMT3- als auch in den pGEX-4T-1-Vektor eingeführten T7-Promotor unter Verwendung des bakteriellen BL21-CodonPlus<sup>®</sup>-(DE3)-RIL-Expressionsstammes. Der T7-Promotor steht unter der Kontrolle eines *lac*-Operons und wird durch Substratinduktion aktiviert. Durch Zugabe von IPTG wird das *lac*-Operon aktiviert und die Expression induziert, indem das IPTG an den Repressor LacR bindet. Abhängig vom Verwendungszweck wurden Proteinexpressionen in zwei unterschiedlichen Größenmaßstäben durchgeführt.

#### a) Proteinexpression im kleinen Maßstab (Mini-Expression)

Für die Überprüfung der Expression bereits klonierter und sequenzierter rekombinanter PfCCp-Proteine wurden 3 bis 5 Klone von einer LB-Agarplatte mit frisch transformierten BL21-CodonPlus<sup>®</sup>-(DE3)-RIL-Zellen (siehe Kapitel 2.2.1.2) gepickt und in 3 ml LB-Medium unter Zugabe von Antibiotikum überführt. Nach Schüttelinkubation über Nacht bei 37 °C wurde die Kultur in einem Doppelansatz 1:5 in frischem LB-Medium mit Antibiotikum verdünnt und eine weitere Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. In einen der beiden Doppelansätze (+) wurde durch Zugabe von 0,75 mM IPTG die Expression induziert. Der zweite Ansatz (-), dem kein IPTG zugegeben wurde, diente als Negativkontrolle. Von jeder Kultur wurde nach drei Stunden 30 µl Probe entnommen, die 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer und 25 mM DTT versetzt und zehn Minuten bei 95 °C denaturiert wurde. Die Proben konnten anschließend direkt via SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach dem Gellauf angefärbt werden (siehe Kapitel 2.2.3.4) oder sie wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### b) Proteinexpression im großen Maßstab (Maxi-Expression)

Die zuvor im kleinen Maßstab auf ihr Expressionsniveau überprüften rekombinanten Proteine wurden nachfolgend zur Herstellung polyklonaler Antikörper bzw. für Interaktionsstudien im großen Maßstab exprimiert. Hierzu wurden identische Klone von frisch transformierten BL21-CodonPlus<sup>®</sup>-(DE3)-RIL-Zellen gepickt und in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt. Nach Schüttelinkubation über Nacht bei 37 °C wurde zu dem Ansatz 1000 ml frisches, mit Antibiotikum versetztes, LB-Medium gegeben und dieser wurde eineinhalb Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde dann, nachdem sie die logarithmische Wachstumsphase erreicht hatte, für 30 Minuten bei RT geschüttelt, anschließend mit 0,75 mM IPTG induziert und für weitere fünf Stunden bei RT schüttelnd inkubiert. Mit Absenkung der Temperatur sollte

eine langsame, präzise Expression erreicht werden, wobei die zusätzliche Chaperonfunktion des vom pSUMO/pSMT3-Vektor kodierten SUMO-Fusionspeptids eine korrekte Faltung der rekombinanten Proteine unterstützt. Nach erfolgter Expression wurden die Bakterienzellen zehn Minuten bei 5000 x g pelletiert und bis zur Isolation der Proteine (siehe Kapitel 2.2.3.2) bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Proteinisolation erfolgte bei den unter Verwendung des pSUMO/pSMT3-Vektors exprimierten rekombinanten Proteinen mittels Bindung des 6His-Fusionsproteins an Nickel-NTA-Agarose und bei den unter Verwendung des pGEX-4T-1-Vektors exprimierten rekombinanten Proteinen durch Adhäsion des GST-Fusionsproteins an Glutathion-Sepharose. Zur Herstellung von Antikörpern war die Aufreinigung der rekombinanten Proteine Grundvoraussetzung. Infolge eines geringen Expressionsniveaus einiger rekombinanter Proteine wurde als weitere Alternative für die Antikörperherstellung eine Aufreinigung in Form von *Inclusion Bodies* gewählt. Für die Interaktionsstudien wurde hingegen, nach erfolgter Zellyse, das unaufgereinigte Proteingemisch eingesetzt. Um eine Degradierung der Proteine zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Außerdem wurden verwendete Puffer und Lösungen bei 4 °C vorgekühlt.

#### a) Aufreinigung von 6His/SUMO-fusionierten rekombinanten Proteinen

Im Anschluß an die Maxi-Expression (siehe Kapitel 2.2.3.1) wurde das abzentrifugierte Zellpellet in 20 ml einer Lösung aus 50 mM Tris (pH 8,0) und 10% Glycerin resuspendiert, mit Lysepuffer (siehe Kapitel 2.1.5) versetzt und eine Stunde rotierend inkubiert. Zum Zellaufschluß wurde die Suspension mittels einer French<sup>®</sup> Press dreimal mit einem Druck von 1200 psi behandelt und durch zwei Minuten Ultraschallbehandlung (50% Intensität und 50 Zyklen) wurde die DNA zerstört. Durch einstündige Zentrifugation bei 30.000 x g erfolgte die Trennung des proteinhaltigen Überstandes von den Zelltrümmern. Die Proteinlösung wurde, nach Sterilfiltration mit 500 µl gewaschener Nickel-NTA-Agarose versetzt und über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Nickel-NTA-Agarose war zuvor dreimal vorsichtig mit 500 µl Waschpuffer 3 bei 3000 x g gewaschen worden. Das Protein-Agarose-Gemisch wurde auf eine PolyPrep<sup>®</sup>-Säule gegeben und der Durchfluß wurde verworfen. Danach wurde die Säule zweimal mit Waschpuffer 3, einmal mit Waschpuffer 4, nochmals zweimal mit Waschpuffer 3 und einmal mit Waschpuffer 5 (jeweils 10 ml) gespült. Abschließend wurde die Säule dreimal mit Waschpuffer 3 gespült, um unspezifisch an die Nickel-NTA-Agarose gebundene Proteine mit Hilfe der unterschiedlichen Imidazol-

konzentrationen der Puffer zu entfernen. Die Proteinelution erfolgte in Elutionspuffer, welcher in viermal 0,5-ml-Fractionen aufgeteilt wurde. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und des Reinheitsgrades erfolgt die Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; siehe Kapitel 2.2.3.4). Durch Waschen mit PBS unter Verwendung einer Amicon<sup>®</sup> Ultra-15-Zentrifugeneinheit wurde der Elutionspuffer entfernt und die Proteinkonzentration wurde erneut bestimmt. Die Lagerung der aufgereinigten rekombinanten Proteine erfolgte bei -20 °C.

#### b) Aufreinigung von GST-fusionierten rekombinanten Proteinen

Die Maxi-Expression, Zellpelletierung sowie Zellyse und -aufschluß für GST-fusionierte Proteine entsprach der im 6His/SUMO-Protokoll beschriebenen Prozedur. Der Proteinüberstand wurde im Anschluß mit 500 µl gewaschener Glutathion-Sepharose-4FastFlow gemischt und über Nacht rotierend inkubiert. Nachdem das Gemisch auf eine PolyPrep<sup>®</sup>-Säule gegeben wurde, erfolgten zwei Waschgänge mit Waschpuffer 3. Danach wurde einmal mit Waschpuffer 4 und dreimal mit Waschpuffer 3 gewaschen. Die Proteine wurden in viermal 0,5 ml Elutionspuffer eluiert und die Ausbeute sowie der Reinheitsgrad wurden mittels SDS-PAGE bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte ebenfalls bei -20 °C.

#### c) Aufreinigung als *Inclusion Bodies*

Da sowohl die Aufreinigung der 6His/SUMO- als auch der GST-Fusionsproteine keine ausreichende Proteinmenge für die Herstellung von Antikörpern lieferte, wurde noch ein drittes Verfahren zur Gewinnung überexprimierter rekombinanter Proteine angewendet. Bei dieser Methode werden während der Überexpression von Fremdproteinen in bakteriellen Zellen Einschlußkörperchen, sogenannte *Inclusion Bodies*, gebildet. Die aus vollständig synthetisierten, denaturierten Proteinen bestehenden Präzipitate sind nicht membrangebunden und wurden in der vorliegenden Arbeit nach einem Protokoll der Firma ImmunoGlobe (Himmelstadt) isoliert.

Die Maxi-Expression und Zellpelletierung entsprach auch hier der im 6His/SUMO-Protokoll beschriebenen Vorgehensweise. Zur Lyse wurde das Pellet in 80 ml Lysepuffer resuspendiert und mit 200 mg Lysozym in 20 ml Lysepuffer versetzt. Nach 30-minütiger Inkubtion auf Eis wurden 200 ml Detergenzpuffer zugegeben und es erfolgte der Zellaufschluss mittels zehnminütiger Ultraschallbehandlung (50% Intensität und 50 Zyklen). Nach anschließender Zentrifugation bei 5000 x g für zehn Minuten wurde der Überstand verworfen, das amorphe Pellet in 200 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut zehn Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und es folgten weitere 4 bis 6 Waschschrte, bis sich ein festes, weißes Pellet gebildet hatte. Das Pellet wurde mit 200 ml 70%igem Ethanol (p. a.) gewaschen,

in 5 ml 1 x PBS aufgenommen und zehn bis 30 Minuten mit Ultraschall behandelt, bis die aufgebrochenen Proteinaggregate klein genug waren, eine 23-G-Nadel zu passieren. Reinheit und Konzentration wurde mit Hilfe der SDS-PAGE (siehe 2.2.3.4) ermittelt, die aufgereinigten *Inclusion Bodies* wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3.3 Herstellung von Antikörpern

Die Herstellung spezifischer *PfCCp5* und *PfFNPA*-Antikörper war Voraussetzung für eine Vielzahl der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Dazu wurden rekombinante *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine exprimiert und als *Inclusion Bodies* aufgereinigt und anschließend die Konzentration bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.4). Darüber hinaus wurde ebenfalls rekombinantes, 6His/SUMO-fusioniertes *PfCCp5rp2* unter Verwendung von Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt. Für die Herstellung von Antikörpern wurden sechs Wochen alte NMRI-Mäuse mit den so gewonnen rekombinanten Proteinen immunisiert. Die Immunisierungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. Carina Wagner, Frau Dipl. Biol. Nina Simon Frau Ludmilla Solugub und von Frau Stefanie Weiss durchgeführt.

Hierfür wurde in einem Dreifachansatz 100 µg des jeweiligen rekombinanten Proteins in sterilfiltriertem 1 x PBS aufgenommen, anschließend 1:1 mit Freund's-*incomplete*-Adjuvans (300 µl Endvolumen) vermischt und den Mäusen subdermal in drei Depots injiziert. Diese Immunisierung wurde nach vier Wochen wiederholt. Zehn Tage nach der zweiten Immunisierung wurden die Tiere durch Punktur des Herzmuskels ausgeblutet. Dazu wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin nach Herstellerangaben anästhesiert. Die so gewonnenen ca. 1,5 bis 2 ml Vollblut mussten zur Gerinnung eine Stunde bei RT ruhen und anschließend zehn Minuten bei 1300 x g abzentrifugiert werden. Nach Abnahme des Serums wurde dieses mittels Western Blot an dem jeweiligen rekombinanten Protein bzw. an Parasitenlysat und in Immunfluoreszenzstudien getestet. Antiseren, welche eine ausreichend spezifische Bindung an das entsprechende rekombinante und native Protein zeigten, konnten für weiter gehende Studien verwendet werden und wurden bei -20 °C gelagert. Des Weiteren wurde der Firma Biogenes (Berlin) überexprimiertes und aufgereinigtes 6His/SUMO-fusioniertes *PfCCp5rp2*, zur Herstellung von polyklonalem Antiserum in zwei Mäusen, zugesandt.

#### **2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-Gelfärbung sowie -Konservierung und Bestimmung der Proteinkonzentration**

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können einzelne Proteine eines Proteingemisches anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgt im elektrischen Feld, wobei kleine Proteine die Siebstruktur der Polyacrylamidmatrix leichter passieren können als große. Bevor die Proteine im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden können, müssen sie mit einer negativen Ladung versehen und ihre Sekundär- bzw. Tertiärstruktur durch Denaturierung zum Zwecke der Linearisierung zerstört werden. Zur Denaturierung wird das Probenmisch bei 95 °C unter Verwendung des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) und dem Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol erhitzt. Reduzierende Thiolverbindungen, wie z.B. Dithiothreitol (DTT), können zusätzlich Disulfidbrückenbindungen spalten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese mit einem Lämmli-Puffersystem (Lämmli, 1970) verwendet. Die Polyacrylamidmatrix bestand hierbei aus einem hochprozentigen Trenngel (12%), welches mit einem niederprozentigen Sammelgel (5%) überschichtet wurde. In dem weitmaschigen Sammelgel werden die Proteine, aufgrund seines zum Trenngel abweichenden pH-Wertes, zunächst konzentriert. Im Trenngel werden die Proteine dann, entsprechend ihres Molekulargewichts separiert und sind als scharfe Banden sichtbar.

Zur Herstellung des Gels wurde zunächst das 12%ige Trenngel zwischen zwei Glasplatten (1,0 mm Zwischenraum), welche in eine Mini-Protean-3-Station eingespannt wurden, gegossen und mit destilliertem Wasser überschichtet. Die Konzentration des Trenngels wurde dabei anhand der Größe der aufzutrennenden Proteine (180 kDa bis 30 kDa) gewählt. Das Gel wurde 20 Minuten bei RT auspolymerisiert, das Wasser anschließend entfernt und das Trenngel wurde mit dem 5%igen Sammelgel überschichtet. Zur Formung von Taschen wurde in das Sammelgel ein Kamm eingesetzt. Das als Polymerisationsstarter dienende 10%ige APS und der Radikalstabilisator TEMED wurden jeweils erst kurz vor dem Gießen zu beiden Gellösungen (siehe Kapitel 2.1.5) gegeben. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei RT wurde das auspolymerisierte Gel in eine Mini-Protean-3-Apparatur eingespannt und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1 x PAGE-Laufpuffer befüllt und der Kamm wurde gezogen.

Die Proben wurden vor dem Auftragen 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer mit 25 mM DTT gemischt und zehn Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden diese sodann in die Taschen gefüllt. Ein Molekulargewichtsstandard mit Proteinen bekannter Größe diente als Kontrolle (siehe Kapitel 2.1.10). Um die Proteine im

Sammelgel zu konzentrieren, wurde zunächst für 20 Minuten eine Spannung von 85 V angelegt. Hatten die Proben die Trenngelgrenze erreicht, wurde die Spannung auf 125 V erhöht und die Elektrophorese wurde für eineinhalb Stunden fortgeführt. Zur Analyse des Reinheitsgrades sowie zur Bestimmung der Konzentration nach erfolgter Überexpression von Proteinen wurde das Gel anschließend mit *GelCode<sup>®</sup>-Blue-Stain* gefärbt. Vorbereitend zur Färbung eines SDS-Gels mit *GelCode<sup>®</sup>-Blue-Stain* wurde dieses dreimal fünf Minuten in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen. Anschließend wurde das Gel eine Stunde bei RT in der Färbelösung schüttelnd inkubiert. Durch erneutes, mindestens einstündiges Waschen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  wurde überschüssige Färbelösung entfernt bis die einzelnen Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

Zur Konservierung wurden die gefärbten Gele eine halbe Stunde in einer Lösung aus 20%igem Ethanol mit 10% Glycerin schüttelnd äquilibriert und anschließend zwischen zwei Zellophanfolien, welche zuvor zwei Minuten in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  vorgequollen wurden, gelegt. Die so präparierten Gele wurden in einen Rahmen gespannt und 24 Stunden bei RT getrocknet.

Durch visuellen Vergleich der Bandendicke der aufgereinigten Proteine mit denjenigen des Molekulargewichtsstandards konnte im Anschluß ihre Konzentration abgeschätzt werden. Bei 5  $\mu\text{l}$  Gelauftrag entsprach laut Herstellerangaben jede Proteinbande des Größenstandards einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}$ . Für die Immundetektionen im Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine bzw. Zellysate hingegen auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe. Kapitel 2.2.3.5).

### **2.2.3.5 Western-Blot-Analyse**

Für die Immundetektion können mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung binden diese infolge hydrophober Wechselwirkungen an die Membran und können im Anschluß mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gefolgt von einer enzymatischen Reaktion detektiert werden. Hierfür wurde zuerst das SDS-Gel aus den zwei Glasplatten herausgelöst, das Sammelgel vorsichtig entfernt und kurz in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  geschwenkt. Zum Aufbau des Blots wurde auf das schwarze Gitter der Transferkassette zunächst ein in Transferpuffer getränktes Vlies gelegt, auf welches zwei in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere platziert wurden (Abb. 2.19). Auf diese wurde das Gel gelegt und die Membran wurde luftblasenfrei darüber gedeckt. Es folgten zwei weitere Lagen Whatman-Filterpapier und ein weiteres Vlies. Die Transferkassette wurde vorsichtig verschlossen und in einer Halterung in den Puffertank eingesetzt, sodaß die Membran in Richtung Anode orientiert war.

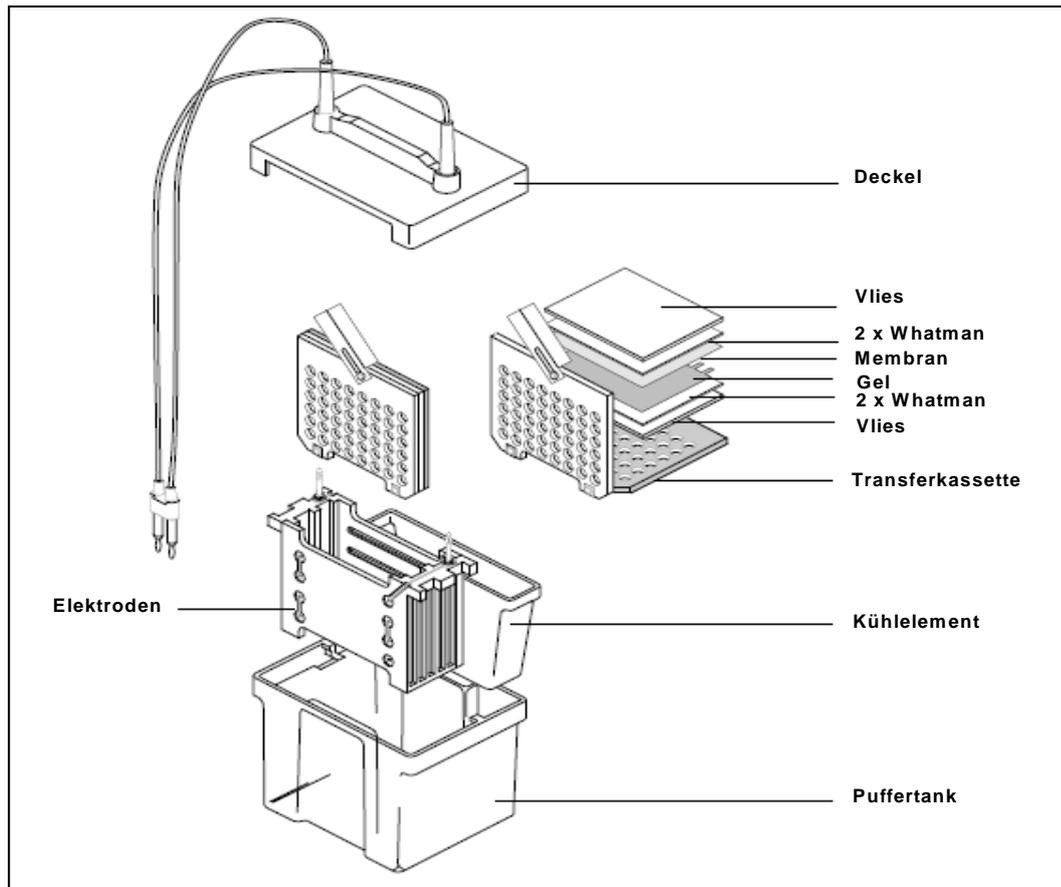


Abb. 2.19. Komponenten der Mini-Trans-Blot-Apparatur und Aufbau eines Western Blots.

Nach Einsetzen eines Kühlelementes in den Tank wurde dieser mit Transferpuffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte für zwei Stunden bei 25 V bzw. über Nacht bei 15 V. Nach Abschluß des Transfers wurde die Membran kurz in TBS geschwenkt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mit einer Lösung aus 1%igen BSA in 5% TBSM eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach zwei zehnmütigen Waschstufen in TBS erfolgte die Inkubation mit dem in 3% TBSM verdünnten Primärantikörper für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf der Wippe. Ungebundener Antikörper wurde durch fünfminütiges Waschen in 3% TBSM, zweimal zehnmütiges Waschen in 3% TBSM mit 0,1% Tween und erneutes fünfminütiges Waschen in 3% TBSM entfernt. Der an alkalische Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper wurde im Anschluss ebenfalls in 3% TBSM verdünnt und die Inkubation erfolgte entweder eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Es schlossen sich ein zehnmütiger Waschgang in TBS, zwei zehnmütige Waschgänge in einer Lösung aus 0,1%igem Tween in TBS und ein weiterer zehnmütiger Waschschrift in TBS an. Zur Erhöhung des pH-Wertes wurde die Membran danach für drei Minuten in Equilibrierungspuffer inkubiert, bevor die Immundetektion erfolgte. Dazu wurde eine Tablette des Substrats der alkalischen Phosphatase (NBT/BCIP) in 10 ml  $H_2O_{bidest}$  gelöst und auf die Membran gegeben.

Nach fünf bis 20 Minuten wurde die enzymatische Farbreaktion mittels 20-minütiges Schwenkens in Stopp-Puffer beendet. An der Stelle, an dem Antikörper gebunden wurde, war nun eine violett gefärbte Bande sichtbar. Zum Trocknen wurde die Membran zwischen zwei Zellulosepapiere gelegt und anschließend wurde diese mit dem Scanner Perfection 4990 Photo eingescannt.

### 2.2.3.6 Interaktionsstudien mittels Ko-Immünpräzipitationen

Um die Funktion und mögliche Wechselwirkungen der *PfCCp*-Proteine genauer zu analysieren, wurden sowohl Interaktionsstudien mittels Ko-Immünpräzipitationen als auch mittels Affinitätschromatographiestudien durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3.7). Eine Ko-Immünpräzipitation (IP) dient dem Nachweis möglicher Wechselwirkungen nativer Proteine untereinander. Hierfür werden spezifisch an das zu untersuchende Protein bindende Antikörper (Köder) einem Proteingemisch beigefügt. Durch anschließende Zugabe von ProteinG-beads kann dann das zu untersuchende Protein samt seiner möglichen Interaktionspartner (Beute) aus dem Probengemisch präzipitiert werden. Protein G ist ein Oberflächenprotein von *Streptococcus spec.*, das an die Fc-Domäne von IgG-Immunglobulinen binden kann (Bjorck und Kronwall, 1984). Das Prinzip der Ko-Immünpräzipitation ist in Abb. 2.20 dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine aus dem Lysat reifer NF54-WT-Gametozyten präzipitiert und mittels Western Blot analysiert. Zur Verhinderung von Protein-Degradationen wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt.

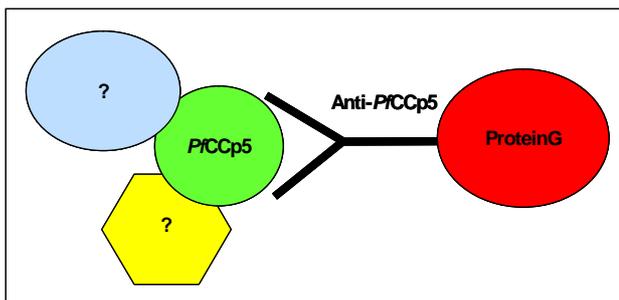


Abb. 2.20. Prinzip einer Ko-Immünpräzipitation am Beispiel von *PfCCp5*.

Für die Ko-Immünpräzipitation wurden aufgereinigte Gametozyten (pro Ansatz je 2 Kulturflaschen) jeweils in 200 µl PBS-Mix aufgenommen (siehe Kapitel 2.2.1.7 und 2.1.5) und mit einem Zellhomogenisator zunächst in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mechanisch zerkleinert sowie durch einminütige Ultraschallbehandlung (50% Intensität und 50 Zyklen) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden eine Minute bei 16.000 x g abzentrifugiert, der proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine 30 Minuten mit 8 µl neutralem Mäuseserum rotierend inkubiert. Anschließend wurden dem Gemisch

20 µl ProteinG-*beads* zugeben und eine Stunde unter Rotation inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für eine Minute bei 3000 x g wurde der vorgereinigte Überstand in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit dem entsprechenden Antikörper (siehe Tab. 2.10) ein bis drei Stunden rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden 20 µl ProteinG-*beads* zu dem Ansatz gegeben, welcher über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert und nachfolgend durch Zentrifugation bei 3000 x g für fünf Minuten sedimentiert wurde. Das Pellet wurde 3 bis 5 mal in vorgekühltem 1 x PBS gewaschen und nachfolgend sofort in 25 µl PBS und 35 µl Probenpuffer mit 25 mM DTT aufgenommen sowie bei 95 °C für zehn Minuten erhitzt, kurz abgekühlt und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Dabei wurde pro Geltasche jeweils die Hälfte der präzipitierten Probe aufgetragen. Mittels spezifischer Antikörper erfolgt dann die Analyse möglicher Interaktionspartner im Western Blot (siehe Kapitel 2.2.3.5).

Tab. 2.10 Auflistung der in der IP verwendeten Antikörper und der eingesetzten Volumina

Antikörper	Volumen
Anti- <i>PfCCp1/1rp1</i>	8 µl
Anti- <i>PfCCp4/4rp1</i>	20 µl
Anti- <i>PfCCp5/5rp2</i>	32 µl
Anti- <i>PfFNPA/FNPArp2</i>	8 µl

Als Negativkontrolle wurden Ko-Immünpräzipitationen unter Verwendung spezifisch gegen das ER assoziierte *Pf39*-Protein gerichtete Antikörper verwendet (Templeton *et al.*, 1997). *Pf39* sollte aufgrund seiner Lokalisation nicht mit Proteinen der parasitophoren Vakuole interagieren können. Als weitere Negativkontrolle wurde eine Immunpräzipitation unter Verwendung von 1 x PBS anstatt des Primärantikörpers verwendet und nachfolgend im Western Blot mit Antiseren gegen *PfCCp1* detektiert. Als Positivkontrolle wurden Ko-Immünpräzipitationen und anschließend Western-Blot-Analysen durchgeführt, indem der an die ProteinG-*beads* bindende Antikörper und der zur Detektierung verwendete Antikörper (Anti-*PfCCp5/5rp2* bzw. Anti-*PfFNPA/FNPArp2*) identisch waren. Diese Positivkontrolle diente dem Nachweis der Anwesenheit der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine im jeweiligen Präzipitat.

### 2.2.3.7 Interaktionsstudien mittels Affinitätschromatographien

Anhand von Affinitätschromatographien können im Gegensatz zu Ko-Immünpräzipitationen direkte Wechselwirkungen zwischen den Domänen einzelner

rekombinanter Proteine untersucht werden. Die durchgeführten Affinitätschromatographiestudien wurden an ausgewählten rekombinanten *PfCCp*-Domänen, nach dem Köder-Beute-Prinzip, vorgenommen (Abb. 2.21). Hierfür wurde in der eigenen Arbeitsgruppe ein Set rekombinanter *PfCCp*-Domänen sowohl als 6His/SUMO- als auch als GST-Fusionsproteine kloniert.

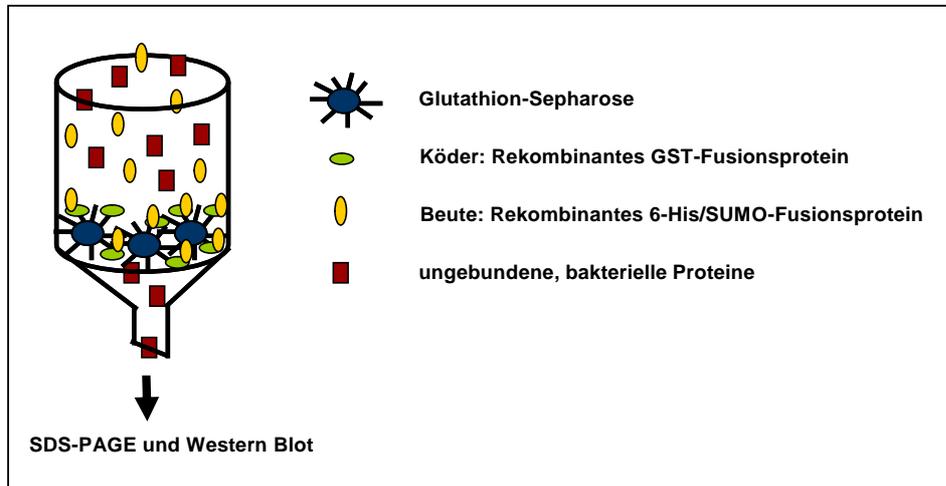


Abb. 2.21 Schemadarstellung einer Affinitätschromatographie nach dem Köder-Beute-Prinzip. Quelle: N. Simon, verändert.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Affinitätschromatographiestudien wurden die rekombinanten *PfCC1rp1*, *PfCC3rp1*, *PfCC3rp3* und *PfCC3rp4* als GST-Fusionsproteine sowie die rekombinanten *PfCC5rp1*, *PfCC5rp2*, *PfFNPArp1* und *PfFNPArp1* als 6His/SUMO-Fusionsproteine in einer Maxi-Expression mit einem Endvolumen von 3000 ml überexprimiert (siehe Kapitel 2.2.3.1). Zur Verhinderung von Protein-Degradationen wurden alle nachfolgenden Arbeitsschritte bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Das Bakterienpellet wurde zunächst unter Verwendung von Lysepuffer (siehe Kapitel 2.1.5) sowie drei Zyklen French<sup>®</sup> Press (1200 psi Druck) aufgeschlossen. Nach zweiminütiger Ultraschallbehandlung (50% Intensität und 50 Zyklen) erfolgte die Trennung des proteinhaltigen Überstandes der GST-Fusionsproteine mittels Zentrifugation (siehe Kapitel 2.2.3.2). Dieser wurde mit 500 µl Glutathion-Sepharose versetzt und über Nacht unter Rotation inkubiert. Sodann wurde der mit Glutathion-Sepharose versetzte Überstand jeweils eines GST-fusionierten *PfCCp*-Proteins auf eine PolyPrep<sup>®</sup>-Säule gegeben, damit sich die an die Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine am Grund der Säule aufkonzentrierten. Ungebundene Proteine wurden durch drei nachfolgende Waschungen mit gekühltem 1 x PBS entfernt. Anschließend wurde auf die Säule der Überstand eines überexprimierten 6His/SUMO-fusionierten *PfCCp*-Proteins gegeben und der Durchfluss

wurde verworfen. Die Säule wurde danach fünfmal mit 1 x PBS gewaschen und die Elution erfolgte dreimal in jeweils 3 x 500 µl GST-Elutionspuffer.

Bei einer Ko-Elution, d. h. also bei einer Interaktion der beiden rekombinanten *PfCCp*-Domänen konnten mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung der an alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-His- und Anti-GST-Antikörper sowohl das GST-Fusionsprotein (Köder) als auch das gebundene 6His/SUMO-Fusionsprotein (Beute) nachgewiesen werden. Fand jedoch keine Interaktion statt, wurde das 6His/SUMO-Fusionsproteine ausgewaschen und eine Ko-Elution war nicht möglich. In diesem Falle war keine 6His-Bande im Western Blot detektierbar (siehe Kapitel 2.2.3.5). Alle Affinitätschromatographien wurden mindestens dreimal wiederholt. Der Durchfluss des letzten Waschschrittes vor der Elution wurde ebenfalls mittels Western Blot analysiert. Er diente der Kontrolle, dass ungebundene Proteine vollständig von der Säule gespült wurden. Der Durchfluss der überexprimierten rekombinanten GST- und 6His/SUMO-fusionierten Proteine diente als Positivkontrolle der Überprüfung eines ausreichenden Expressionsniveaus der rekombinanten Proteine und wurde stets im Western Blot mitgeführt. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde außerdem eingehend jeweils mit Hilfe einer SDS-PAGE und nachfolgender Gelfärbung kontrolliert und diente als zusätzliche Positivkontrolle. Darüber hinaus wurde eine Bindung des GST- und des 6His/SUMO-Fragments überprüft und ausgeschlossen.

### **2.2.3.8 Viabilitätstest an asexuellen *P.-falciparum*-Blutstadien**

Im Rahmen des SFB 630 synthetisierte Inhibitoren wurden auf ihre antiplasmodiale Aktivität mit Hilfe des Malstat-Viabilitätsassays im Mikrodilutionsverfahren getestet. Der Malstat-Assay beruht auf dem Nachweis von *Plasmodium*-spezifischer Laktatdehydrogenase (pLDH), die im Gegensatz zur humanen Laktatdehydrogenase (hLDH) 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid (APAD) als NAD-Analog verwenden kann. Der pLDH wird APAD zusammen mit Laktat angeboten und die Laktatgärung anschließend durch eine Färbemethode nachgewiesen (Goodyer *et al.*, 1997; Makler *et al.*, 1993, 1998). Die pLDH ist ein essentielles Enzym in der anaeroben Glykolyse von *P. falciparum*. Sie katalysiert die Reduktion von Pyruvat unter Verbrauch von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu Lactat und ist damit letztlich für die Bereitstellung von ATP während der asexuellen erythrozytären Entwicklungsphase des Erregers verantwortlich. Das gebildete  $\text{NAD}^+$  steht anschließend für den weiteren Ablauf der Glykolyse zur Verfügung. *P. falciparum* nutzt hierbei den Glucoseabbauweg der Erythrozyten und exprimiert die zur hLDH homologe pLDH, welche jedoch 200fach schneller APAD umsetzen kann als  $\text{NAD}^+$  (Gomez *et al.*, 1997). Im Malstat-Assay findet eine Rück-

reaktion von Laktat zu Pyruvat unter Verwendung des  $\text{NAD}^+$ -Analog APAD statt und entstandenes APAD +  $\text{H}^+$  führt, nach Zugabe des Substrates NBT, zu einem violetten Farbumschlag des Mediums in Anwesenheit vitaler Parasiten. Der Test ist somit ein sehr sensitives (Detektierung bis zu 0,1% Parasitämie), quantitatives Verfahren mit der diejenige Hemmstoff-Konzentration, bei der das Laktat-dehydrogenase-Enzym halbmaximal gehemmt ( $\text{IC}_{50}$ -Konzentration) wird, bestimmt werden kann. Zur Durchführung eines Viabilitätstests mit den erhaltenen Inhibitoren waren folgende Arbeitsschritte nötig.

a) Einstellung der Parasitämie und Ausplattieren in 96-Loch-Mikrotiterplatten

Für den Viabilitätstest wurden synchronisierte, asexuelle *P. falciparum*-3D7-Parasiten verwendet, welche sich im Ring- bzw. Trophozitenstadium befanden (siehe Kapitel 2.2.1.5). Die Parasitämie der gewünschten Stammkultur wurde hierfür mittels Giemsa-Ausstrich bestimmt und durch entsprechende Verdünnung mit AlbuMax™II-Medium mit humanen Erythrozyten (Blutgruppe A, Rhesusfaktor positiv, 5% Hämatokrit) auf 1% Parasitämie eingestellt (siehe Kapitel 2.2.1.5). Pro Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden dann 180  $\mu\text{l}$  der verdünnten Kultur ausplattiert.

b) Herstellung einer Mikrodilutionsreihe der getesteten Inhibitoren

Der Messbereich der in der vorliegenden Arbeit getesteten Peptidomimetika lag zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 10 pM (logarithmisch äquidistant,  $\log_{10}$ ). Dazu wurden von jedem Inhibitor Stammlösungen in einer Konzentration von 20 mM in 100% DMSO hergestellt, die bis zur weiteren Verwendung unter Lichtabschluss bei 4°C gelagert wurden. Zur Ermittlung der halbmaximalen Hemmkonzentration wurden die Stammlösungen der einzelnen Substanzen dann zunächst 1:20 in AlbuMax™II-Medium verdünnt (Dilution A1;  $10^0$  mM). Die Dilution A1 wurden anschließend 1:10 in 5%igem DMSO-Medium verdünnt (Dilution A2;  $10^{-1}$  mM). Alle weiteren Dilutionen wurden jeweils aus der vorherigen durch eine 1:10 Verdünnung in 5%igem DMSO-Medium hergestellt (A3-A8;  $10^{-2}$  mM- $10^{-7}$  mM; Abb. 2.22 A). Durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Verdünnungsstufe zu 180  $\mu\text{l}$  Kultur wurde eine Endkonzentration von  $10^{-1}$  mM- $10^{-8}$  mM Substanz und 0,5% DMSO pro Loch erreicht.

Der Messbereich der in den Viabilitätstest eingesetzten Etacrynsäurederivate lag zwischen 1 mM und 10 pM. Dazu wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 200 mM in 100% DMSO hergestellt. Anschließend wurden die Stammlösungen der Substanzen 1:20 in AlbuMax™II-Medium verdünnt (Dilution A1;  $10^1$  mM). Dilution A1 wurde nachfolgend 1:10 in 5%igem DMSO-Medium verdünnt (Dilution A2;  $10^0$  mM). Die folgenden Dilutionen wurden ebenfalls jeweils aus der vorherigen durch eine 1:10 Verdünnung in 5%igem DMSO-Medium hergestellt (A3-A9;  $10^{-1}$  mM- $10^{-7}$  mM; Abb.

2.22 B), sodass eine Endkonzentration von  $10^0$  mM- $10^{-8}$  mM Substanz und 0,5% DMSO pro Loch erreicht wurde.

Da mit diesen Verdünnungsstufen eine exakte Bestimmung der  $IC_{50}$ -Konzentration jedoch nicht möglich war, wurden in einer weiteren Testreihe Dilutionen mit einem Meßbereich von  $10^0$  mM- $10^{-4}$  mM gewählt, wobei zwischen 1 mM und 100  $\mu$ M zusätzliche, logarithmisch equidistante Dilutionsstufen eingeführt wurden. Hierzu wurden, ausgehend von der Konzentrationsstufe A1 ( $10^1$  mM), 4:5 Verdünnungen (A2-A11;  $10^{0,9}$  mM- $10^0$  mM; Abb. 2.22 C) in 5%igem DMSO-Medium angefertigt. Von der entsprechenden Dilution wurden dann ebenfalls 20  $\mu$ l zu 180  $\mu$ l Kultur gegeben.

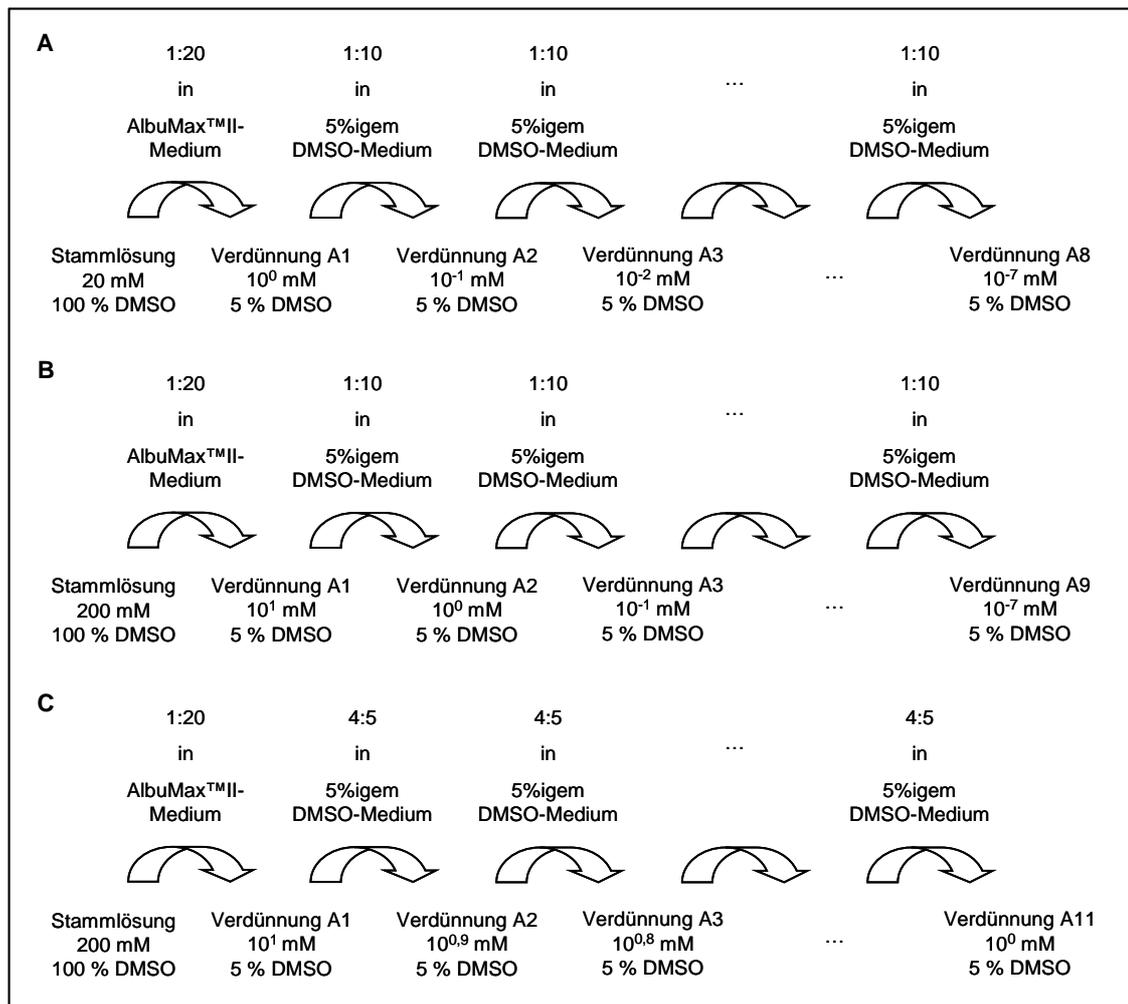


Abb. 2.22. Schema zur Herstellung der Verdünnungsreihen der getesteten Inhibitoren für den Vaibilitätstest an asexuellen *P.-falciparum*-Blutstadien. A. Verdünnungsschema für die Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration der Peptidomimetika B. und C. Verdünnungsschema für die Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration der Etacrynsäurederivate vor (B) und nach Einführung (C) zusätzlicher Dilutionsstufen zwischen 1 mM und 100  $\mu$ M.

Alle oben angeführten Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Zur Validierung des Messergebnisses wurde jede Dilutionsstufe in einer Vierfach-Bestimmung getestet und der Test wurde dreimal wiederholt. Als Referenz wurden sowohl mit 0,5% DMSO-Medium (Negativkontrolle) behandelte 3D7-*P.-falciparum*-Blutkulturen als auch mit Chloroquin-Medium (Positivkontrolle) behandelte 3D7-*P.-falciparum*-Blutkulturen mitgeführt. Des Weiteren wurde eine Chloroquin-Verdünnungsreihe mit einer Endkonzentration von  $10^{-1}$  mM- $10^{-8}$  mM hergestellt und an synchronisierten, asexuellen *P.-falciparum*-3D7-Parasiten getestet und mit den Literaturwerten verglichen.

Nach dem Aussäen der 1%igen *P.-falciparum*-3D7-Stammkultur in 96-Loch-Mikrotiterplatten und der Zugabe der Inhibitoren wurden diese in einen befeuchteten, luftdichten Exsikator überführt und für eine Minute mit 5% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub> begast. Der Exsikator mit den Platten wurde im Anschluss für 72 Stunden Brutschrank bei 37°C inkubiert.

#### c) Durchführung des Malstat-Viabilitätsassays

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Platten aus dem Exsikator entnommen und die Kulturen in den Loch-Vertiefungen im eigenen Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 20 µl mit Hilfe einer Multikanal-Pipette in eine neue 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Pro Loch wurden sodann 100 µl Malstat-Lösung sowie 20 µl eines 1:1 Gemisches aus NBT-Lösung und Diaphorase-Lösung zugefügt und die Platten wurden für 30 bis 50 Minuten schüttelnd inkubiert, bis die parasiten-positiven Vertiefungen eine violette Färbung aufwiesen (Abb. 2.23). Anschließend wurde die Farbreaktion sofort bei einer Wellenlänge von 630 nm im ELISA-Reader gemessen.



Abb. 2.23. Beispiel einer mit Inhibitor inkubierten *P.-falciparum*-3D7-Blutkultur nach Durchführung des Malstat-Assays. Der violette Farbumschlag zeigt das Vorhandensein von vitalen Parasiten an.

Die Messergebnisse wurden mit dem GraphPad Prism4 Programm ausgewertet und die IC<sub>50</sub>-Konzentration wurde bestimmt. Dabei wurde von jeder Vierfach-Bestimmung der Mittelwert aus den gemessenen Werten der Optischen Dichte (OD) gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Die mit Chloroquin-Medium sowie mit 5%igem DMSO-Medium behandelten Kontrollen zeigten die korrekte Einhaltung der Kulturbedingungen bzw. mögliche Wachstumsstörungen der verwendeten Kultur an.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung von *PfCCp5* und *PfFNPA* im Lebenszyklus von *P. falciparum*

##### 3.1.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper in Mäusen für nachfolgende Analysen der Proteinexpression von *PfCCp5* sowie *PfFNPA* war die Klonierung, Expression und Aufreinigung entsprechender rekombinanter Proteine notwendig. Zunächst mussten dazu domänenüberspannende *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Regionen unter Verwendung von gDNA, welche aus asexuellen NF54-WT-Blutstadien isoliert wurde, amplifiziert werden. Über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI sowie *Not*I wurden dann die erhaltenen Fragmente entweder in den pSUMO/pSMT3- oder den pGex-4T-1-Expressionsvektor ligiert (siehe Kapitel 2.2.2.2 bis 2.2.2.9 und 2.2.2.11). Der pSUMO/pSMT3-Vektor besitzt ein 6His/SUMO- und der pGex-4T-1-Vektor besitzt ein GST-Fusionsfragment für die Aufreinigung der jeweiligen Fusionsproteine mittels Nickel-NTA-Agarose bzw. Glutathion-Sepharose nach erfolgter Überexpression. Die relative Position der *PfCCp5*- bzw. *PfFNPA*-Fragmente ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die Größen der amplifizierten DNA-Fragmente und die daraus resultierende molekulare Masse der rekombinanten Proteine sind in Tab. 3.1 angegeben.

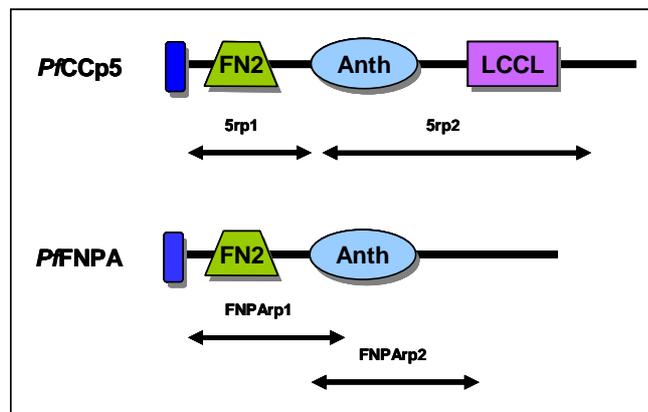


Abb. 3.1. Relative Position der amplifizierten DNA-Fragmente zur Herstellung rekombinanter *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine. Quelle: Dr. phil. nat. G. Pradel, verändert.

Tab. 3.1. Größe der DNA-Fragmente sowie die molekulare Masse der rekombinanten Proteine

Bezeichnung	Fragmentgröße in bp	molekulare Masse in kDa inkl. GST-Fragment (26 kDa)	molekulare Masse in kDa inkl. 6His/SUMO-Fragment (13 kDa)
<i>PfCCp5rp1</i>	1033	-	53
<i>PfCCp5rp2</i>	1185	-	60
<i>PfFNPArp1</i>	1144	-	56
<i>PfFNPArp2</i>	1345	77	64

Die Amplifikation der *PfCCp5rp2*-, *PfFNPArp1*- und *PfFNPArp2*-Konstrukte sowie deren Klonierung in den pSUMO/pSMT3-Vektor waren bereits von Frau Dr. Gabriele Pradel am Weill Medical College in New York durchgeführt worden. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich *PfCCp5rp1* als 6His/SUMO-Fusionsprotein und *PfFNPArp2* als GST-Fusionsprotein hergestellt. Für beide rekombinanten Konstrukte wurde die korrekte Nukleinsäureabfolge jeweils eines Klons mittels Sequenzierung bestätigt und das Expressionsvermögen aller korrekten Klone des jeweiligen rekombinanten Proteins wurde getestet.

### 3.1.1.1 Expression rekombinanter *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine

Anhand von Mini-Expressionen wurde die Expression der rekombinanten Konstrukte überprüft. Nach Transformation in BL21-(DE3)-RIL-Bakterienzellen wurden dazu jeweils vier Klone von jeder Platte gepickt, in 3 ml LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums über Nacht schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag, wurde, nach 1:5 Verdünnung der Doppelansätze, je eine der beiden identischen Kulturen mit 0,75 mM IPTG induziert (siehe Kapitel 2.2.1.2 und 2.2.3.1). Die Analyse der Proteinexpression erfolgte durch SDS-Page und Gelfärbung (siehe Kapitel 2.2.3.4). Die vier überexprimierten Klone des *PfCCp5rp1*-6His/SUMO-Konstrukts wiesen eine Proteinbande auf, welche etwas höher migrierte als errechnet. Die vier induzierten Klone des *PfCCp5rp2*-6His/SUMO-Konstrukts wiesen hingegen alle eine Proteinbande entsprechend der errechneten Höhe auf (Abb. 3.2). Bei der Expressionskontrolle für das *PfFNPArp1*-6His/SUMO-Konstrukt konnte in den vier Klonen ebenfalls ein überexprimiertes Protein detektiert werden, welches auf der errechneten Höhe von 56 kDa migrierte. Bei der Analyse der Expressionskontrolle des *PfFNPArp2*-6His/SUMO-Konstrukts konnte für alle Klone eine schwach exprimierte Proteinbande auf der erwarteten Höhe von 64 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.3).

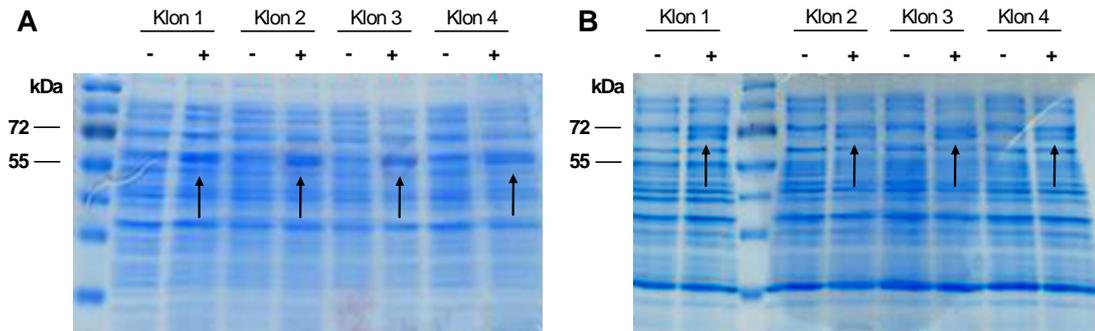


Abb. 3.2. Expressionskontrolle der *PfCCp5rp1*- und *PfCCp5rp2*-6His/SUMO-Konstrukte. A. alle vier analysierten Klone des *PfCCp5rp1*-6His/SUMO-Konstrukts exprimierten ein Protein, welches eine etwas größere molekulare Masse aufwies als errechnet (53 kDa). B. Die vier untersuchten Klone des *PfCCp5rp2*-6His/SUMO-Konstrukts exprimierten ein Protein entsprechend der errechneten Masse von 60 kDa. +, IPTG-Induktion; -, ohne Induktion; Pfeil, überexprimiertes Protein.

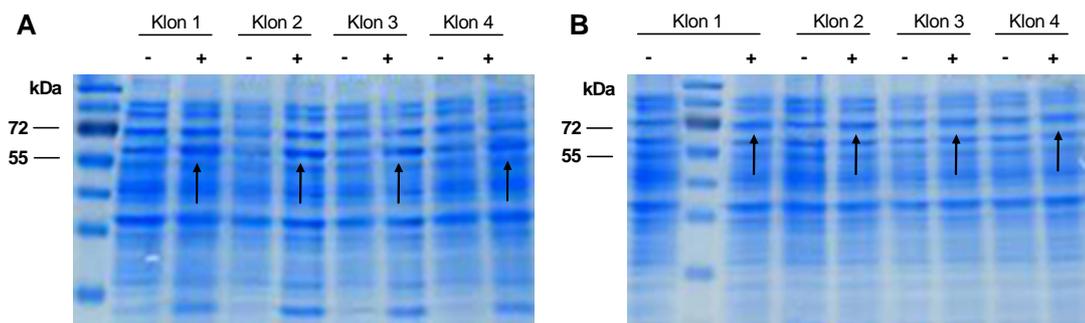


Abb. 3.3. Expressionskontrolle der *PfFNPArp1*- und *PfFNPArp2*-6His/SUMO-Konstrukte. A. alle vier analysierten Klone des *PfFNPArp1*-6His/SUMO-Konstrukts exprimierten ein Protein, der errechneten molekularen Masse von 56 kDa. B. Die vier untersuchten Klone des *PfFNPArp2*-6His/SUMO-Konstrukts exprimierten nur schwach ein Protein entsprechend der errechneten Masse von 64 kDa. +, IPTG-Induktion; -, ohne Induktion; Pfeil, überexprimiertes Protein.

Aufgrund des geringen Expressionsniveaus des *PfFNPArp2*-6His/SUMO-Konstrukts wurde zusätzlich ein *PfFNPArp2*-GST-Fusionsprotein hergestellt (siehe Tab. 3.1). Von dem klonierten *PfFNPArp2*-GST/pGex-Konstrukt wurden ebenfalls vier Klone in Bezug auf ihre Fähigkeit zu exprimieren überprüft, diese zeigten jedoch keine überexprimierte Proteinbande auf der erwarteten Höhe von 77 kDa. Für die Maxi-Expression und anschließende Proteinaufreinigung wurden daher nur die 6His/SUMO-Fusionsproteine verwendet. Dazu wurde jeweils derjenige Klon, welcher die beste Expression aufwies, ausgewählt.

Die Maxi-Expression und die Aufreinigung der Proteine wurde wie in den Kapiteln 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben durchgeführt und die Protein-elution erfolgte in viermal 0,5 ml Fraktionen mit Hilfe des 6His-Elutionspuffers. Wie die Analyse der Proteinexpression nach SDS-Page und Gelfärbung zeigte, lieferte die Aufreinigung der 6His/SUMO-Fusionsproteine nach Bindung an Nickel-NTA-Agarose nur eine geringe Proteinmenge, die für eine, wie in Kapitel 2.2.3.3 beschriebene, Immunisierung der Mäuse nicht genügend Material lieferte (Abb. 3.4).

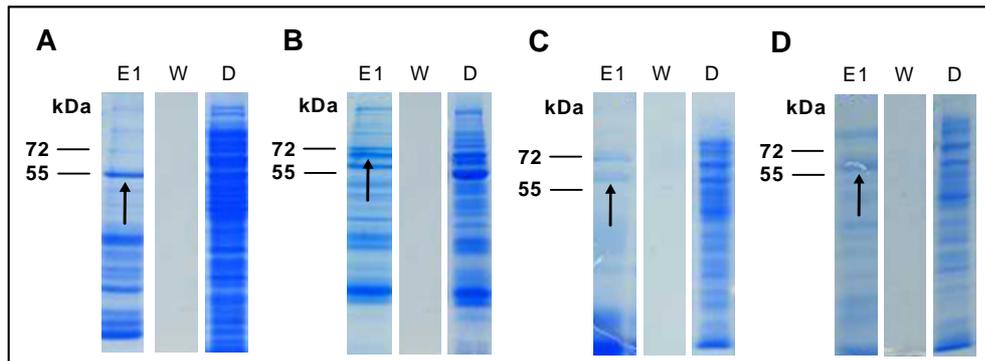


Abb. 3.4. Analyse der Proteinaufreinigungen der 6His/SUMO-Fusionsproteine nach Bindung an Nickel-NTA-Agarose. A. Die Aufreinigung der Maxi-Expression des *PfCCp5rp1*-6His/SUMO-Konstrukts (Klons 2) enthielt nur eine geringe Menge rekombinantes *PfCCp5rp1*-Protein. B. Die Elution des *PfCCp5rp2*-6His/SUMO-Konstrukts (Klon 1) wies ebenfalls nur eine geringe Menge rekombinantes *PfCCp5rp2*-Protein auf. C. Die Aufreinigung von des *PfFNPArp1*-6His/SUMO-Konstrukts (Klon 3) nach Maxi-Expression wies eine nur sehr geringe Menge an rekombinantes *PfFNPArp1*-Protein auf. D. Nach Aufreinigung des *PfFNPArp2*-6His/SUMO-Konstrukts (Klon 2) enthielt lediglich die erste Fraktion rekombinantes *PfFNPArp2*-Protein. E1; Fraktion 1 der Protein-Elutionen; W, Kontrolle des letzten Waschschrittes mit Waschpuffer 3; D, Kontrolle des Durchflusses nach Bindung an Ni-NTA-Agarose; Pfeil, Höhe des überexprimierten rekombinanten Proteins.

Da die Aufreinigungen der 6His/SUMO-Fusionsproteine mittels Nickel-NTA-Agarose nur sehr begrenzte Proteinmengen lieferten, wurden für die Immunisierung rekombinante *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine nach erfolgter Maxi-Expression als *Inclusion Bodies* aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.3.2). Wie die Analyse der Proteinexpression nach SDS-Page und Gelfärbung zeigte, wies die *Inclusion-Body*-Aufreinigung des rekombinanten *PfCCp5rp1*-6His/SUMO-Fusionsproteins eine Konzentration von ca. 0,3 µg/µl und die Aufreiniung des *PfCCp5rp2*-6His/SUMO-Fusionsproteins eine Konzentration von ca. 0,5 µg/µl auf (Abb. 3.5). Die Aufreinigungen der *PfFNPArp1*-6His/SUMO- und der *PfFNPArp2*-6His/SUMO-Fusionsproteine enthielten jeweils eine Konzentration von 0,3 µg/µl bzw. 1 µg/µl Protein.

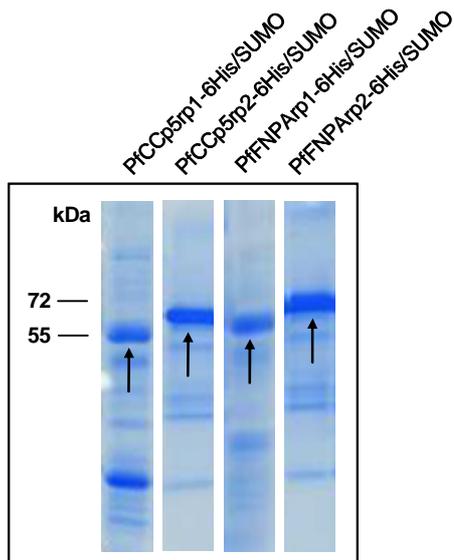


Abb. 3.5. Analyse der Proteinmenge nach *Inclusion-Body*-Aufreinigung der rekombinanten *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine. Die Ausbeute betrug etwa 0,3 µg/µl für *PfCCp5rp1-6His/SUMO*, etwa 0,5 µg/µl für *PfCCp5rp2-6His/SUMO*, etwa 0,3 µg/µl für *PfFNPArp1-6His/SUMO* und etwa 1 µg/µl für *PfFNPArp2-6His/SUMO*.

### 3.1.1.2 Test der Immunsereen an rekombinanten Proteinen und an *P.-falciparum*-NF54-Gametozytenlysat

Im Anschluss an die Aufreinigung als *Inclusion Bodies* wurden die rekombinanten *PfCCp5rp1*-, *PfCCp5rp2*-, *PfFNPArp1*- und *PfFNPArp2-6His/SUMO*-Proteine zur Immunisierung von je drei Mäusen verwendet (siehe Kapitel 2.2.3.3). Der Test der Antiseren erfolgte zunächst mittels Western-Blot-Analysen an 1.0 µg des entsprechenden rekombinanten Proteins. Für alle Seren konnte eine spezifische Bindung an ihre rekombinanten Proteine nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Vor der Immunisierung wurde den Mäusen Schwanzblut abgenommen. Das daraus gewonnene neutrale Mausserum diente als Negativkontrolle. Es wurde ebenfalls mittels Western-Blot-Analyse an 1.0 µg rekombinantem *PfCCp5rp1* getestet und detektierte erwartungsgemäß keine Proteinbande.

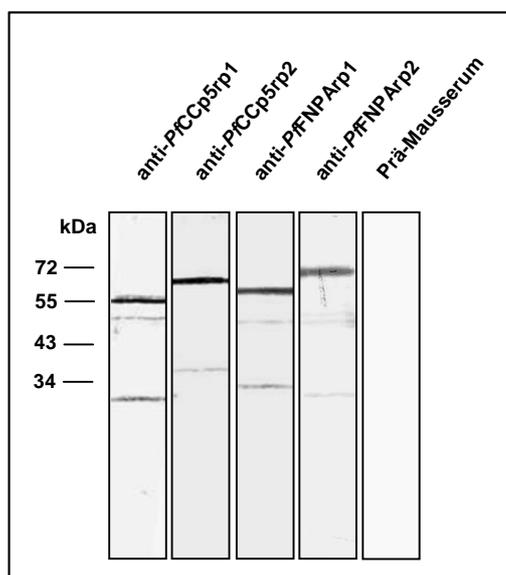


Abb. 3.6. Western-Blot-Analyse der polyclonalen Mausseren an ihren rekombinanten Proteinen. Die polyclonalen Seren gegen *PfCCp5rp1* und *PfCCp5rp2* detektierten Proteinbanden der erwarteten molekularen Massen von 53 und 60 kDa. Die Seren gegen *PfFNPArp1* sowie *PfFNPArp2* markierten ebenfalls Banden entsprechend der errechneten molekularen Massen der rekombinanten Proteine (56 bzw. 64 kDa). An *PfCCp5rp1* getestetes neutrales Mausserum (Prä-Mausserum) diente als Negativkontrolle und detektierte keine Bande.

Anschließend wurden diese Antiseren an aufgereinigten NF54-WT-Gametozyten auf ihre Fähigkeit, ihr entsprechendes natives Protein zu erkennen, getestet. Des Weiteren wurden die im Labor von Prof. T. J. Templeton (New York, USA) ebenfalls in Mäusen generierten Antiseren (anti-*PfCCp5rp2TT* und anti-*PfFNPArp2TT*) gegen die rekombinanten *PfCCp5rp2*- und *PfFNPArp2*-6His/SUMO-Proteine an Lysaten von aufgereinigten NF54-WT-Gametozyten getestet (Abb. 3.7).

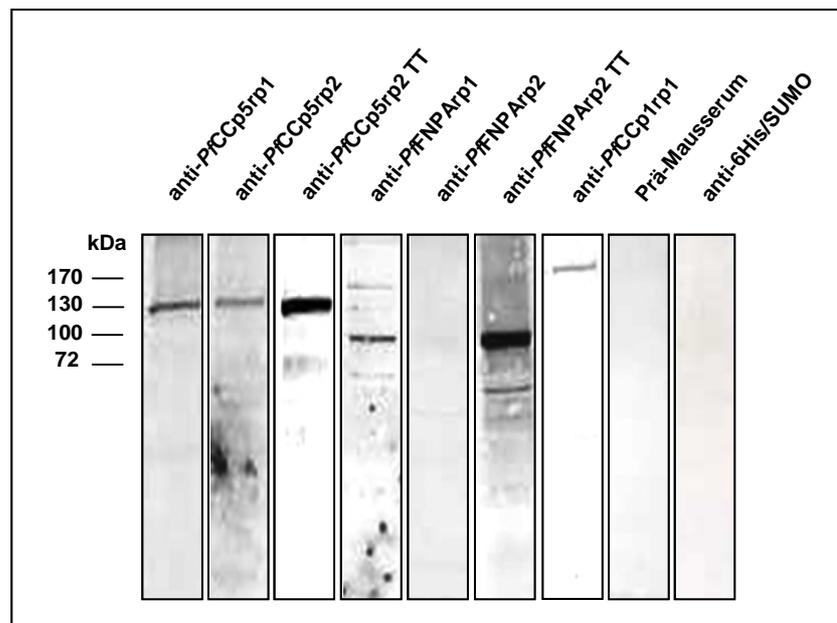


Abb. 3.7. Western-Blot-Analysen der generierten *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Antiseren an NF54-WT-Lysat aufgereinigter Gametozyten. Die polyklonalen Mausseren gegen *PfCCp5rp1* und *PfCCp5rp2* detektierten endogenes *PfCCp5* (125 kDa) in NF54-WT-Gametozytenlysat. Das polyklonale Mausserum anti-*PfFNPArp1* und das Antiserum anti-*PfFNPArp2TT* erkannten ebenfalls endogenes *PfFNPA*-Protein (100 kDa). Eine spezifische Bindung des Antiserums anti-*PfFNPArp2* an *PfFNPA*-Protein unter Verwendung von NF54-WT-Gametozytenlysat konnte nicht gezeigt werden. Als Positivkontrolle diente NF54-WT-Gametozytenlysat unter Verwendung von polyklonalem Mausserum, welches endogenes *PfCCp1rp1* (180 kDa) erkannte. Als Negativkontrolle diente NF54-WT-Gametozytenlysat unter Verwendung von neutralem Mausserum (Prä-Mausserum) bzw. Antiserum gerichtet gegen das 6His/SUMO-Fragment. Polyklonale Mausseren: anti-*PfCCp5rp1*, anti-*PfCCp5rp2*, *PfCCp5rp2TT*, anti-*PfFNPArp1*, anti-*PfFNPArp2*, anti-*PfFNPArp2TT*, anti-*PfCCp1rp1* und anti-6His/SUMO

Sowohl die Antiseren gegen *PfCCp5rp1* als auch gegen *PfCCp5rp2* detektierten eine Proteinbande, welche der errechneten molekularen Masse des endogenen *PfCCp5*-Proteins entsprach (125 kDa). Mit dem in unserem Labor hergestellten und gegen *PfFNPArp1* gerichteten Antiserum konnte ebenfalls ein Protein der erwarteten molekularen Masse von 100 kDa für endogenes *PfFNPA* nachgewiesen werden. Von den beiden Antiseren gegen *PfFNPArp2* konnte nur für anti-*PfFNPArp2TT* eine

spezifische Bindung an endogenes *PfFNPA* gezeigt werden. Zusätzlich detektierte sowohl das anti-*PfFNPA*rp1 als auch das anti-*PfFNPA*rp2TT Antiserum jeweils eine schwächere Bande bei 150 kDa und bei etwa 64 kDa. Bei letzterem Produkt könnte es sich um ein Prozessierungsprodukt von *PfFNPA* handeln. Jedoch könnten die beiden Proteinbanden auch auf eine unspezifische Kreuzreaktion zurückzuführen sein. Als Positivkontrolle wurde polyklonales Mausserum gegen *PfCCp1*rp1 (180 kDa) eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten neutrales Mausserum und Antiserum gerichtet gegen das 6His/SUMO-Fragment der rekombinanten Proteine. Beide Negativkontrollen detektierten hierbei wie erwartet keine Banden.

### 3.1.2 Expressionsanalysen der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine

#### 3.1.2.1 Analyse der Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* auf RNA-Ebene

Für die Transkriptanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA* erfolgte die Isolation von RNA, wie in Kapitel 2.2.2.10 beschrieben, aus Trophozoiten, Schizonten, Gametozyten, Gameten und Zygoten der *P.-falciparum*-NF54-WT-Parasitenzelllinie sowie aus Schizonten der *P.-falciparum*-F12-Parasitenzelllinie, welche keine Gametozyten bilden können. Die isolierte RNA wurde anschließend zur Transkriptanalyse mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben und in eine diagnostische semi-quantitative PCR mit 35 Zyklen eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.2.2).

Die Analyse der semi-quantitativen PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese zeigte ein hohes Expressionsniveau von *PfCCp5* in Schizonten, Gametozyten sowie Gameten und ein geringeres Expressionsniveau in Zygoten von NF54-WT-Parasiten. Eine Expression in Trophozoiten der NF54-WT-Parasiten und in Schizonten der F12-Parasiten konnte nicht nachgewiesen werden. Die Expressionsanalyse von *PfFNPA* auf mRNA-Ebene zeigte ein hohes Expressionsniveau in Gametozyten und Gameten sowie ein geringeres Expressionsniveau in Zygoten von NF54-WT-Parasiten. In Trophozoiten und Schizonten von NF54-WT-Parasiten und in Schizonten von F12-Parasiten konnte kein Transkript nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Zur Kontrolle wurden Oligonukleotidpaare gegen *PfAMA-1*, welches in Trophozoiten und Schizonten exprimiert wird (Peterson *et al.*, 1989; Narum und Thomas, 1994; Hodder *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1996), gegen *PfCCp1* (Expression in Gametozyten und Makrogameten; Pradel *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2007), gegen *Pfs25* (Expression in Makrogameten, Zygoten und Ookineten; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990) und gegen *Pfs28*, welches in Zygoten und Ookineten exprimiert wird (Duffy und Kaslow, 1997), mitgeführt. Des Weiteren wurde genomische DNA für die Positivkontrollen (+)

verwendet und Reaktionen ohne DNA dienten als Negativkontrollen (-). Außerdem wurden als zusätzliche Kontrolle einer möglichen Verunreinigung mit genomischer DNA sowohl Ansätze mit (+) als auch ohne (-) Zufügung von reverser Transkriptase verwendet.

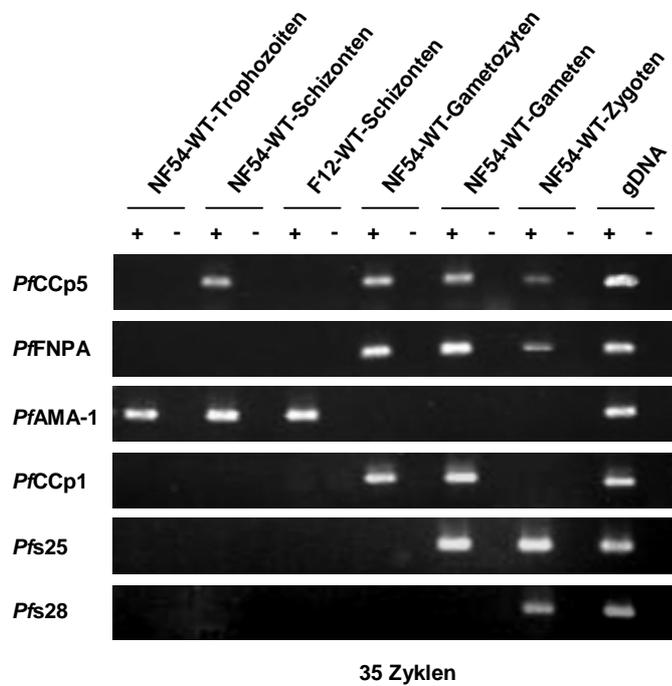


Abb. 3.8. Stadienspezifische Transkriptanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA*. Die Semi-quantitative RT-PCR zeigte nach 35 Zyklen ein hohes Expressionsniveau von *PfCCp5*-mRNA in aufgereinigten Schizonten, Gametozyten, Gameten und ein schwächeres in Zygoten von NF54-WT-Parasiten. Eine Expression in Trophozoiten der NF54-WT-Parasitenzelllinie sowie in Schizonten der F12-Parasitenzelllinie konnte nicht nachgewiesen werden. Die Transkriptanalyse zeigte nach 35 Zyklen ein hohes Expressionsniveau von *PfFNPA*-mRNA in Gametozyten, Gameten und ebenso ein schwächeres in Zygoten von NF54-WT-Parasiten. Keine Expression von *PfFNPA* konnte in Trophozoiten und Schizonten der NF54-WT-Parasitenzelllinie sowie in Schizonten der F12-Parasitenzelllinie detektiert werden. Kontrollen: *PfAMA-1*, Trophozoiten und Schizonten; *PfCCp1*, Gametozyten und Gameten; *Pfs25*, Gameten und Zygoten; *Pfs28*, Zygoten; Positivkontrolle, gDNA (-); Negativkontrolle, ohne gDNA (-); +/-, Ansätze mit bzw. ohne Zufügung von reverser Transkriptase.

### 3.1.2.2 Stadienspezifische Expressionsstudien von *PfCCp5* und *PfFNPA* auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen

Die stadienspezifischen Expressionsanalysen wurden mit den jeweiligen spezifisch bindenden Antisera (anti-*PfCCp5*rp1, anti-*PfCCp5*rp2, *PfCCp5*rp2 TT, anti-*PfFNPA*rp1 und anti-*PfFNPA*rp2TT; siehe Kapitel 3.1.1.2) zunächst mittels Western-

Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden aufgereinigte NF54-WT-Trophozoiten, Schizonten, Gametozyten, Gameten, sowie Zygoten verwendet. Die Expressionsstudien anhand von Western-Blot-Analysen zeigten, wie die oben beschriebenen RT-PCR-Studien (siehe Kapitel 3.1.2.1), ein hohes Expressionsniveau in Gametozyten, Gameten sowie ein schwächeres Expressionsniveau in Zygoten von *PfCCp5*. Das aufgereinigte NF54-WT-Schizontenlysat wies ebenfalls eine, wenn auch schwache, Proteinbande der erwarteten molekularen Masse von 125 kDa für *PfCCp5* auf. In NF54-WT-Schizontenlysat waren jedoch zusätzlich zwei Banden bei etwa 90 kDa und bei etwa 80 kDa detektierbar. Bei diesen Produkten könnte es sich ebenfalls um Prozessierungsprodukte von *PfCCp5* handeln. Jedoch könnten diese beiden Proteinbanden ebenso auf eine unspezifische Kreuzreaktion zurückzuführen sein. Eine Expression in Trophozoiten konnte nicht nachgewiesen werden. In Gametozyten und Gameten konnte ebenso ein hohes Expressionsniveau für *PfFNPA* gezeigt werden, während in Zygoten eine schwächere Expression detektiert wurde. In Trophozoiten und Schizonten war hingegen keine Proteinbande mit der für *PfFNPA* erwarteten molekularen Masse von 100 kDa detektierbar (Abb. 3.9).

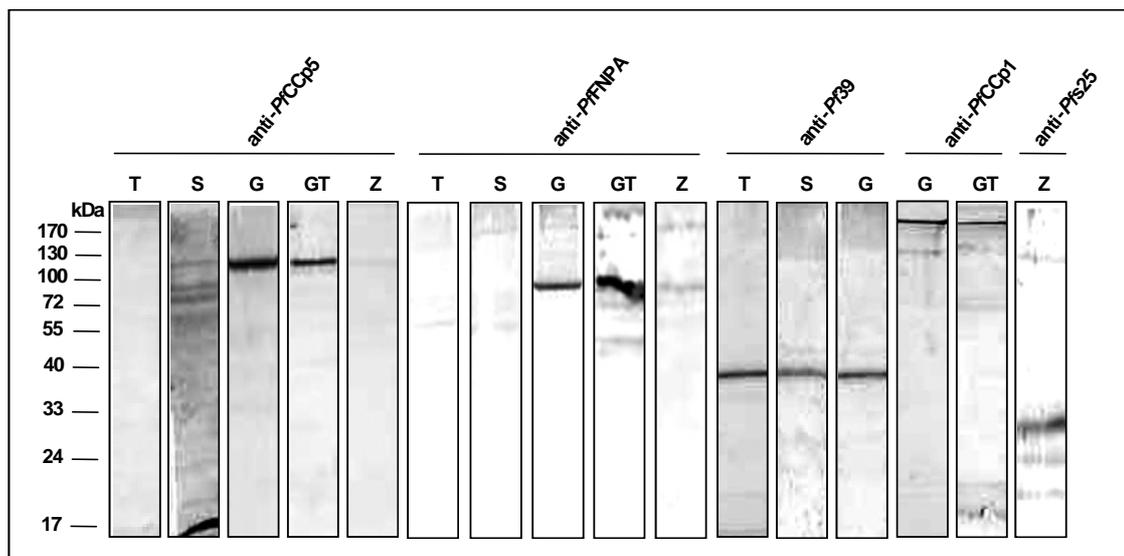


Abb. 3.9. Stadienspezifische Western-Blot-Analysen polyklonaler Mausseren gerichtet gegen *PfCCp5*- und *PfFNPA*. Die Western-Blot-Analysen an NF54-WT-Lysat aufgereinigter Trophozoiten (T), Schizonten (S), Gametozyten (G), Gameten (GT) und Zygoten (Z) zeigten ein hohes Expressionsniveau von *PfCCp5* (125 kDa) in NF54-WT-Gametozyten- und Gametenlysat, sowie eine schwache Expression in Zygoten- und Schizontenlysat. Die NF54-WT-Gametozyten- und -Gametenlysate wiesen ebenfalls ein hohes Expressionsniveau des *PfFNPA*-Proteins (100 kDa) auf. Das Expressionsniveau von *PfFNPA* in NF54-WT-Zygotenlysat war dagegen schwächer und in Trophozoiten- bzw. Schizontenlysat konnte keine Expression nachgewiesen werden. Kontrollen (siehe Text): *Pf39* (39 kDa), Trophozoiten, Schizonten und Gametozyten; *PfCCp1* (180 kDa), Gametozyten und Gameten; *Pfs25* (25 kDa), Zygoten.

Polyklonale Mausseren gegen *Pf39* und *PfCCp1* sowie polyklonales Kaninchenserum gegen *Pfs25* dienten als Kontrollen. *Pf39* ist ein mit dem ER assoziiertes Protein und wird in Trophozoiten, Schizonten und in Gametozyten exprimiert (Templeton *et al.*, 1997). Mittels des *Pf39*- und des *PfCCp1*-Antiserums konnte eine gleichmäßige Proteinbeladung der Gelspuren in den entsprechenden Lysaten überprüft werden. Das *Pfs25*-Antiserum, gerichtet gegen in Zygoten exprimiertes *Pfs25*-Protein, detektierte neben der erwarteten Proteinbande von 25 kDa weitere Banden in NF54-Zygotenlysat, bei denen es sich um Spaltprodukte des *Pfs25*-Proteins handelt.

### 3.1.2.3 Stadienspezifische Expressionsstudien von *PfCCp5* und *PfFNPA* auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzstudien

Weitere stadienspezifische Expressionsstudien von *PfCCp5* und *PfFNPA* auf Proteinebene wurden anhand indirekter Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1.9). Hierfür wurden die oben beschriebenen polyklonalen Mausseren, (anti-*PfCCp5rp1*, anti-*PfCCp5rp2*, anti-*PfCCp5rp2TT*, anti-*PfFNPArp1*, anti-*PfFNPArp2* und anti-*PfFNPArp2TT*) verwendet. Sowohl für *PfCCp5* als auch für *PfFNPA*, konnte eine Expression in den Gametozytenstadien II bis V gezeigt werden (Abb. 3.10).

Beide Proteine weisen hierbei, ähnlich wie *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*, eine oberflächenassoziierte Expression in Gametozyten auf (siehe Kapitel 1.4.2). Dabei war eine punktierte Proteinverteilung von *PfCCp5* und *PfFNPA* in den Gametozytenstadien II-V zu beobachten sowie, mit fortschreitendem Reifegrad der Gametozyten, eine zunehmende Konzentrierung beider Proteine an den Polen der Parasiten. Eine Freisetzung von *PfCCp5* und *PfFNPA* nach Aktivierung der Gametozyten, wie es für *PfCCp1* bis *PfCCp3* beschrieben wurde, konnte nicht nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich auch auf der Oberfläche von Makrogameten ein hohes Expressionsniveau sowohl von *PfCCp5* als auch von *PfFNPA* (Abb. 3.10). Eine Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Gametozyten des Stadium I konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, da dieses Stadium morphologisch nicht von späten Trophozoiten unterscheidbar ist. Als Negativkontrollen wurden neutrales Mausserum und Mausseren gegen das 6His/SUMO-Fragment verwendet, welche keine Markierung aufwiesen.

Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Expressionsanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA* in asexuellen Stadien zeigten keine Expression der zwei Proteine in jungen Trophozoiten (Abb. 3.11 A und B). Für *PfCCp5* konnte eine Expression in einem Teil sequestrierter Schizonten detektiert werden (Abb. 3.12 A). Eine Expression von *PfFNPA* war hingegen in Schizonten nicht detektierbar (Abb. 3.12 B).

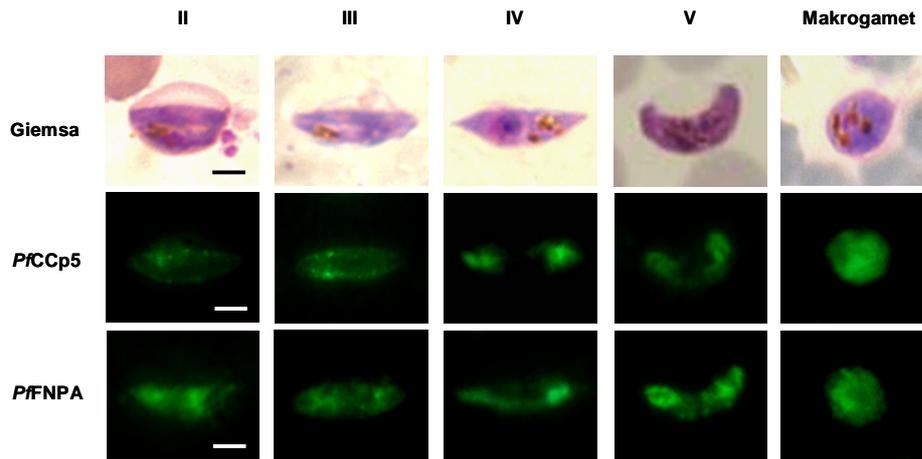


Abb. 3.10. Expressionsanalysen von *PfCCp5* und *PfFNPA* auf Proteinebene. Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung polyklonaler Mausseren gegen *PfCCp5* und *PfFNPA* sowie eines Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpers (in Grün) zeigten eine oberflächenassoziierte Expression. Dabei war eine punktierte Proteinverteilung von *PfCCp5* und *PfFNPA* in den Gametozytenstadien II-V zu beobachten (mittlere und untere Reihe), sowie eine zunehmende Konzentrierung beider Proteine an den Polen der Gametozyten in den Stadien IV und V. In Makrogameten wiesen *PfCCp5* und *PfFNPA* eine deutliche, ebenfalls oberflächenassoziierte Expression auf. Giemsa gefärbte Blutausstriche veranschaulichen die morphologischen Unterschiede der Gametozytenstadien II-V und von Gameten (obere Reihe); Größenangabe, 2  $\mu\text{m}$ .

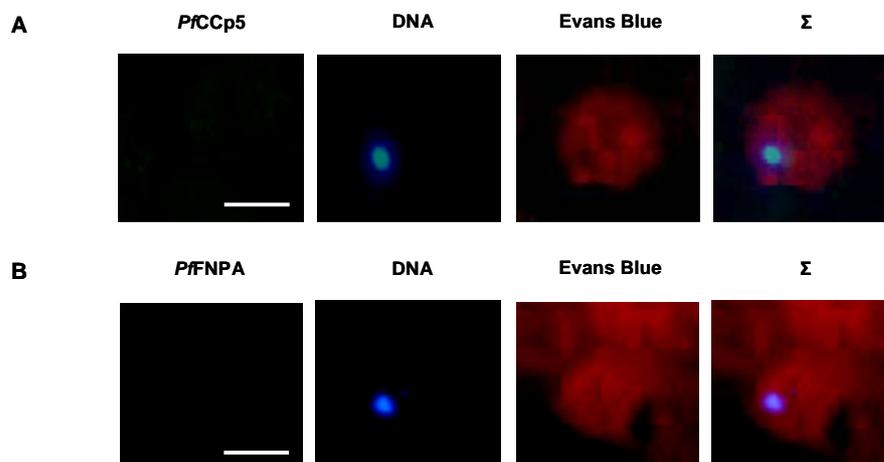


Abb. 3.11. Expressionsanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Trophozoiten anhand von Immunfluoreszenzuntersuchungen. A. Polyklonale Mausseren gegen *PfCCp5* und grünfluoreszierender Alexa-Fluor-488-gekoppelter Sekundärantikörper detektierten in Immunfluoreszenzuntersuchungen keine Expression von *PfCCp5* in Trophozoiten. B. Auch die polyklonalen Mausseren gegen *PfFNPA* und des grünfluoreszierenden Alexa-488-Fluor-gekoppelten Sekundärantikörpers detektierten keine Expression von *PfFNPA* in Trophozoiten. Blau, Kernmaterialfärbung mit *Hoechst Nuclear Stain*; Rot, Gegenfärbung der Erythrozyten mit *Evans Blue*;  $\Sigma$ , Überlagerung der Einzelbilder; Größenangabe, 4  $\mu\text{m}$ .

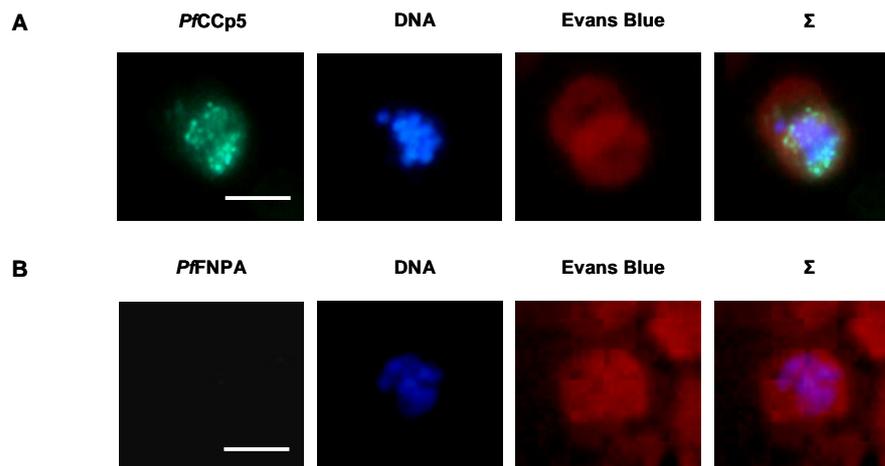


Abb. 3.12. Expressionsanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Schizonten. A. Detektierung unter Verwendung von polyklonalem Mausserum gegen *PfCCp5* und dem grünfluoreszierenden Alexa-Fluor-488-gekoppelten Sekundärantikörper zeigte eine Expression von *PfCCp5* in einem Teil sequestrierter Schizonten. B. Immunfluoreszenzuntersuchungen mittels polyklonalem Mausserum gegen *PfFNPA* und des Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpers (in Grün) detektierten keine Expression in Schizonten. Blau, Kernmaterialfärbung mit *Hoechst Nuclear Stain*; Rot, Gegenfärbung der Erythrozyten mit *Evans Blue*;  $\Sigma$ , Überlagerung der Einzelbilder; Größenangabe, 4  $\mu\text{m}$ .

Zur weiterführenden Expressionsanalyse von *PfCCp5* bzw. *PfFNPA* in NF54-WT-Gameten wurden Doppelmarkierungsstudien mit *Pfalpha-Tubulin-II* durchgeführt. Bei *Pfalpha-Tubulin-II* handelt es sich um ein Protein, welches spezifisch in männlichen Gametozyten und Mikrogameten exprimiert wird (Rawlings *et al.*, 1992). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl *PfCCp5* als auch *PfFNPA* zwar in Mikrogametozyten exprimiert werden, jedoch eine Expression in Mikrogameten nicht mehr feststellbar ist (Abb. 3.13 A und B). Eine ausgeprägte geschlechtsspezifische Expression beider Proteine in rein weiblichen bzw. rein männlichen Gametozyten war nicht feststellbar. Doppelmarkierungsstudien mit *Pfs25* (Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990) dienten der Untersuchung der Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Zygoten und Ookineten. Hierfür wurden Mitteldärme aus *Anopheles-stephensi*-Mücken 24 Stunden nach Membranfütterung mit reifen NF54-WT-Gametozyten isoliert, auf einem Objektträger ausgestrichen und für nachfolgende Immunfluoreszenzanalysen 10 Minuten in Methanol fixiert (siehe Kapitel 2.2.1.4).

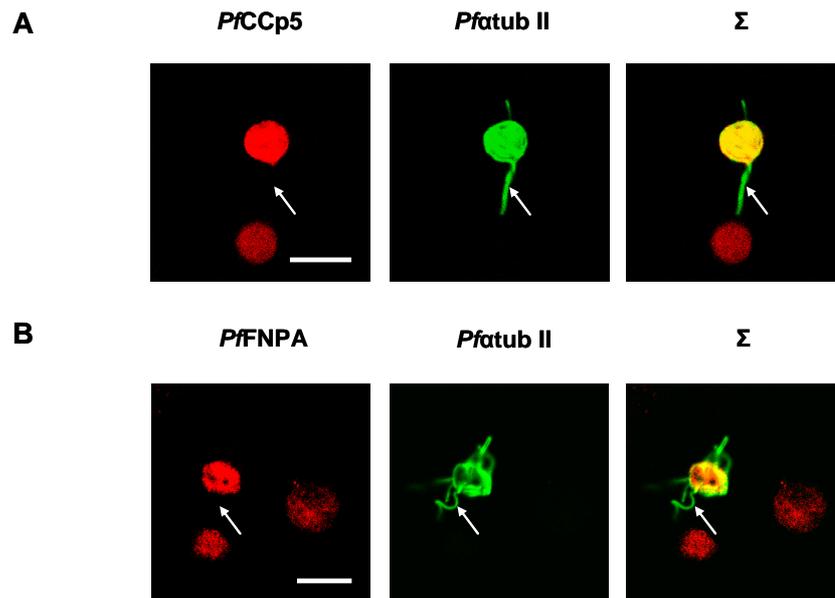


Abb. 3.13. Expressionsanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Gameten. A. Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Mausseren gegen *PfCCp5* und dem Alexa-Fluor-594-gekoppelten Sekundärantikörper (in Rot) sowie Antiseren gegen *Pf*alpha-Tubulin-II und dem Alexa-Fluor-488-gekoppelten Sekundärantikörper (in Grün) zeigten eine Expression von *PfCCp5* in Makrogameten und Mikrogametozyten, jedoch nicht in Mikrogameten. B. Immunfluoreszenz-Analysen mit Hilfe von polyklonalem Mausserum gegen *PfFNPA* und dem Alexa-Fluor-594-gekoppelten Sekundärantikörper (in Rot) sowie Antiseren gegen *Pf*alpha-Tubulin-II und dem Alexa-Fluor-488-gekoppelten Sekundärantikörper (in Grün) detektierten eine Expression von *PfFNPA* in Makrogameten und Mikrogametozyten, allerdings nicht in Mikrogameten. Der Pfeil markiert die Position eines Mikrogameten.  $\Sigma$ , Überlagerung der Einzelbilder; Größenangabe, 5 µm.

Die Expressionsanalyse von *PfCCp5* zeigte eine schwache Expression in Zygoten und im Verlauf der Ookinetenreifung konnte ein völliger Rückgang der *PfCCp5*-Expression beobachtet werden (Abb. 3.14). Analoge Beobachtungen konnten für die Expression von *PfFNPA* gemacht werden. Während für das *PfFNPA*-Protein anhand von Immunfluoreszenzuntersuchungen in Zygoten noch ein schwaches Signal detektiert werden konnte, war dieses Signal in Ookineten nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.15). Zur Unterscheidung der tetraploiden Ookineten mit den in ihrer Morphologie ähnlichen, allerdings haploiden Gametozyten wurde das Kernmaterial mit *Hoechst Nuclear Stain* angefärbt.

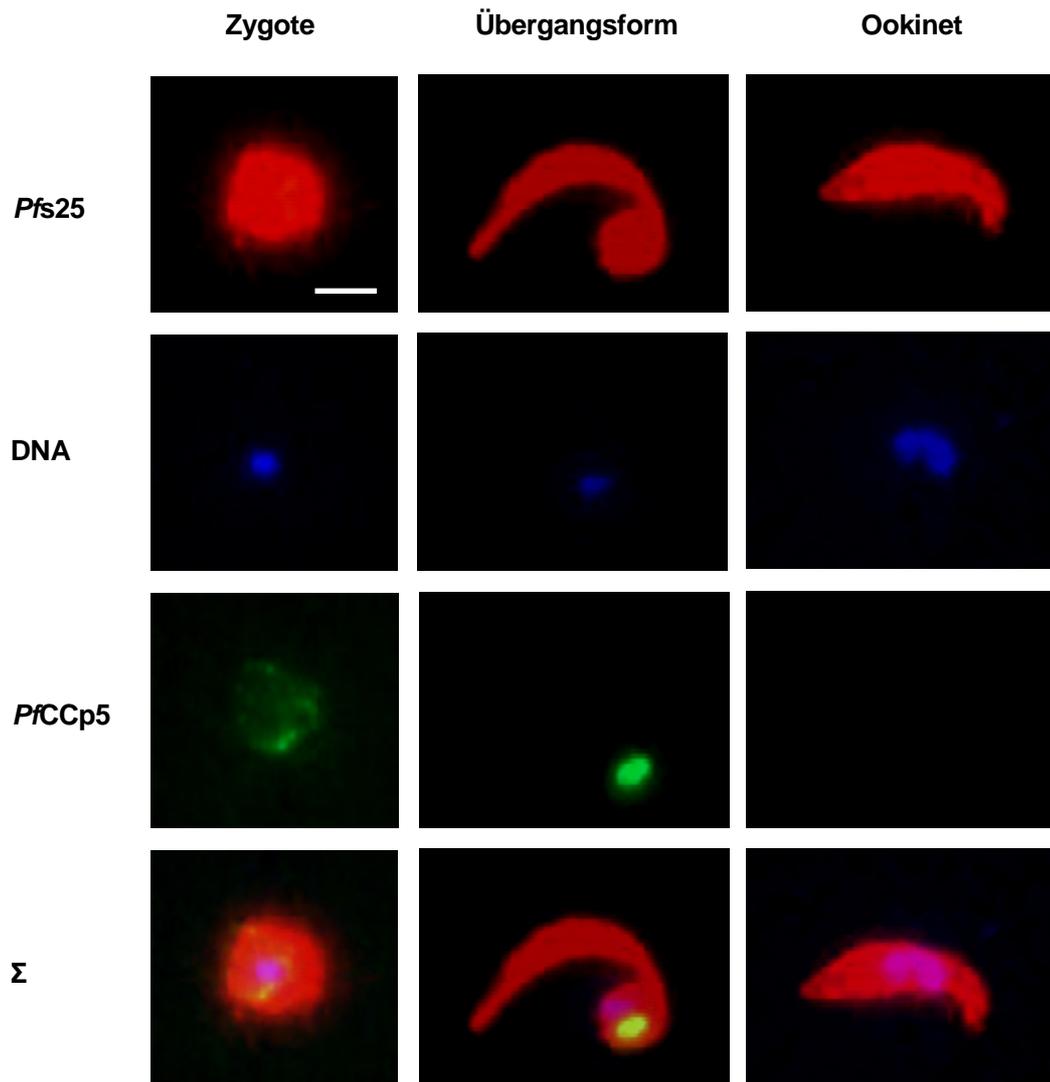


Abb. 3.14. *PfCCp5*-Expressionsanalyse in Zygoten und Ookineten. Doppelmarkierungsstudien an Mückenmitteldärmen unter Verwendung von polyklonalem Mausserum gegen *PfCCp5* und dem Alexa-Fluor-488-gekoppelten Sekundärantikörper (in Grün) sowie Antiseren gegen *Pfs25* und dem Alexa-Fluor-594-gekoppelten Sekundärantikörper (in Rot) zeigten eine schwache Expression von *PfCCp5* in Zygoten sowie einen vollständigen Rückgang der *PfCCp5*-Expression während der Ookinetenreifung. Blau, Kernmaterial gefärbt mit *Hoechst Nuclear Stain*;  $\Sigma$ , Überlagerung der Einzelbilder; Größenangabe, 4  $\mu\text{m}$ .

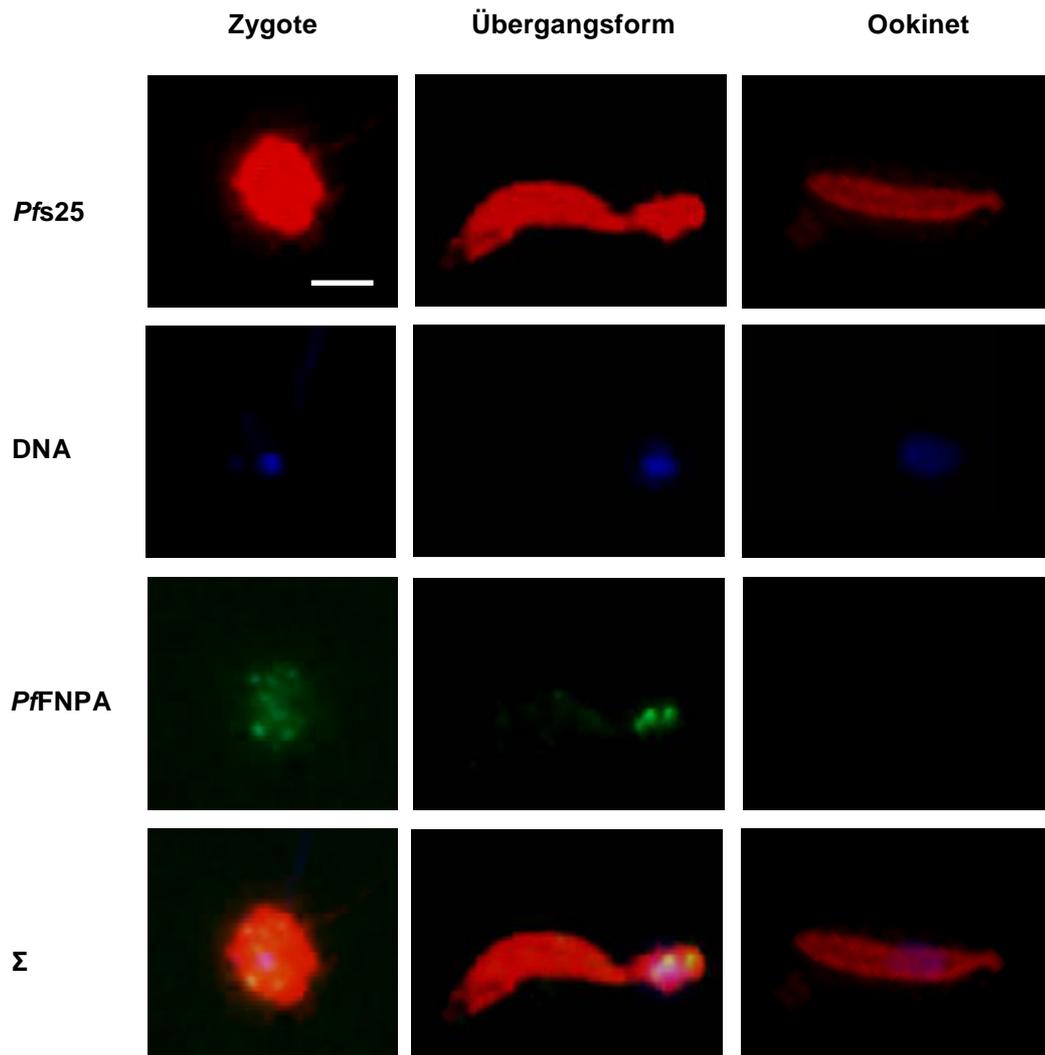


Abb. 3.15. *PfFNPA*-Expressionsanalyse in Zygoten und Ookineten. Doppelmarkierungsstudien an Mückenmitteldärmen unter Verwendung von polyklonalem Mausserum gegen *PfFNPA* und dem Alexa-Fluor-488-gekoppelten Sekundärantikörper (in Grün) sowie Antiseren gegen *Pfs25* und dem Alexa-Fluor-594-gekoppelten Sekundärantikörper (in Rot) zeigten ebenfalls eine schwache Expression von *PfFNPA* in Zygoten sowie einen Rückgang der *PfFNPA*-Expression während der Ookinetenreifung. Blau, Kernmaterial gefärbt mit *Hoechst Nuclear Stain*;  $\Sigma$ , Überlagerung der Einzelbilder; Größenangabe, 4  $\mu\text{m}$ .

Für die Untersuchung der zellulären Lokalisation von *PfCCp5* und *PfFNPA* wurden Immunfluoreszenz-Analysen unter Verwendung von PFA-fixierten NF54-WT-Gameteozyten durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels polyklonaler Mausseren gerichtet gegen *PfCCp5* und *PfFNPA* und dem Alexa-Fluor-488-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Kapitel 2.2.1.9) und es wurden anschließend Schichtaufnahmen anhand eines konfokalen *Laserscanning*-Mikroskops angefertigt. Die Analyse der Stapelprojektionen (SP) sowie der jeweiligen medialen Schnitte (MS) dieser *Laserscanning*-Aufnahmen ließen sowohl auf eine intrazelluläre Lokalisation als

auch auf eine oberflächenassoziation von *PfCCp5* und *PfFNPA* innerhalb der parasitophoren Vakuole reiferer Gametozyten schließen (Abb. 3.16).

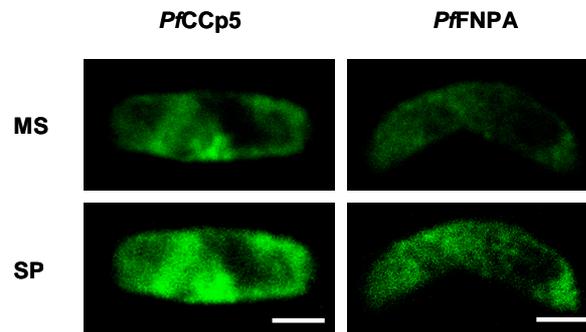


Abb. 3.16. Immunfluoreszenz-Analysen anhand von konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie zur Untersuchung der Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA*. Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie unter Verwendung polyklonaler Mausseren gegen *PfCCp5* und *PfFNPA* ließ auf eine Lokalisierung von *PfCCp5* und *PfFNPA* (in Grün) innerhalb der parasitophoren Vakuole von NF54-WT-Gametozyten schließen. MS, medialer Schnitt; SP, Stapelprojektion; Größenangabe, 2  $\mu\text{m}$ .

#### 3.1.2.4 Ultrastrukturelle Lokalisation von *PfCCp5* und *PfFNPA*

Zur Verifizierung der mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie beobachteten oberflächenassoziierten Lokalisation von *PfCCp5* und *PfFNPA* innerhalb der parasitophoren Vakuole reiferer Gametozyten wurden weiterführende, detaillierte Untersuchungen am Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt. Für die ultrastrukturelle Lokalisation der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine in reifen Gametozyten wurden zunächst Immunmarkierungen mittels ALP bzw. 12-nm-Goldpartikeln angefertigt (siehe Kapitel 2.2.1.10). Es war jedoch präparativ nicht möglich, Goldpartikel in Gametozyten einzuschleusen. Mit Hilfe der ALP-Immunmarkierung konnten hingegen Erkenntnisse über die ultrastrukturelle Lokalisation von *PfCCp5* und *PfFNPA* gewonnen werden. Die Präzipitate des ALP-Substrats am Lokalisationspunkt von *PfCCp5* und *PfFNPA* bestätigten hierbei neben einer intrazellulären Expression beider Proteine ebenso eine oberflächenassoziierte Expression innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten (Abb. 3.17). Als Negativkontrolle wurde eine ALP-Immunmarkierung unter Verwendung von neutralem Mausserum durchgeführt, die keine Markierung zeigte.

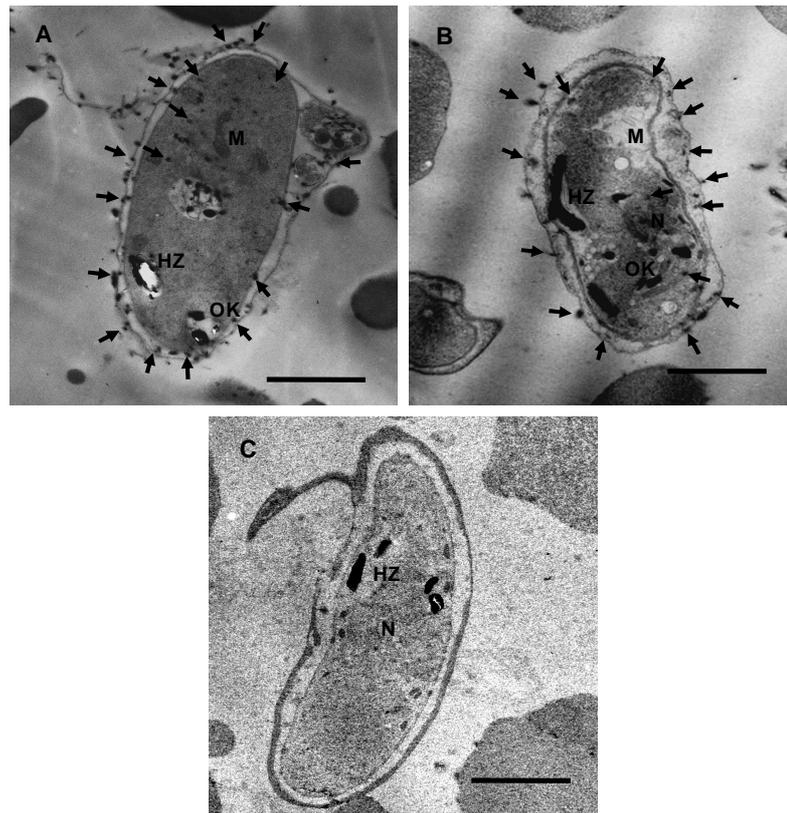


Abb. 3.17. Ultrastrukturelle Lokalisation von *PfCCp5* und *PfFNPA* in reifen Gametozyten. Immunelektronenmikroskopische Analysen bestätigten durch Präzipitate des ALP-Substrats am Antigen (Pfeile) sowohl eine intrazelluläre als auch eine oberflächenassoziierte Lokalisation von *PfCCp5* (A) bzw. *PfFNPA* (B) innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer NF54-WT-Gametozyten. Zur Negativkontrolle wurde eine ALP-Immunkennzeichnung mit neutralem Mausserum (C) durchgeführt, die keine Präzipitate des ALP-Substrats aufwies. HZ, Hämозоин; M, Mitochondrium; N, Nukleus, OK, osmiophile Körperchen; Größenangabe, 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3 Herstellung von *PfCCp5*- bzw. *PfFNPA*-KO- sowie von Komplementations-Parasiten

#### 3.1.3.1 Verifizierung von *PfCCp5*- und *PfFNPA*-KO-Parasiten

Zur Funktionsanalyse des *PfCCp5*- sowie des *PfFNPA*-Proteins mittels Genaus- schaltung in *P. falciparum*-Blutstadien wurden zunächst asexuelle NF54-WT-Parasiten mit dem pDT-Tg23-Plasmid transfiziert, in welches zuvor *PfCCp5*- bzw. *PfFNPA*-DNA- Fragmente kloniert worden waren (siehe Kapitel 2.2.1.8). Trotz dreimaligen Wiederholens der Transfektion war eine stabile homologe *single-crossover*- Rekombination anhand von spezifischen Oligonukleotidpaaren in einer diagnostischen PCR und somit eine Ausschaltung der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Loci nicht nachweisbar. In einem weiteren Ansatz zur funktionellen Zerstörung von *PfCCp5* und *PfFNPA*

wurden daher Fragmente des *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Gens in den pCAM-BSD-KO-Vektor kloniert (*PfCCp5*-BSD-KO1 und *PfFNPA*-BSD-KO1) und in asexuelle NF54-WT-Parasiten transfiziert. Diese Vektoren sollten ebenfalls mittels homologer *single-crossover*-Rekombination in den WT-Locus der beiden Proteine integrieren, wodurch ein pseudo-diploider Genlocus entsteht.

Wie bereits in Kapitel 2.2.1.8 erwähnt, konnte jedoch in den mit dem *PfCCp5*-KO1-Konstrukt und dem *PfFNPA*-KO1-Konstrukt transfizierten NF54-WT-Kulturen, nach erfolgter positiver Selektion, auch nach 90 Tagen noch kein erneutes Parasitenwachstum beobachtet werden. Diese Kulturen wurden daher verworfen. Durch Integration dieser Konstrukte mittels homologer Rekombination in die 5'-Region des WT-Locus des Zielgens sollte versucht werden, eine funktionelle Expression des daraus resultierenden Proteins vollständig zu unterbinden.

Um zu überprüfen, ob eine verkürzte Form des *PfFNPA*-Proteins ebenfalls zu einem Absterben der transfizierten Parasiten führt, wurde zusätzlich ein weiteres Fragment aus dem mittleren Abschnitt der translatierten 5'-Region des *PfFNPA*-Gens in den pCAM-BSD-KO-Vektor kloniert und anschließend in NF54-WT-Parasiten transfiziert. Dieses Konstrukt (*PfFNPA*-BSD-KO2) integriert im Falle einer homologen Rekombination domänenüberspannend in der 3'-Region der FN2- und der 5'-Region der Anth-Domäne von *PfFNPA*, sodass die verkürzte 5'-Region der FN2-Domäne noch exprimiert wird.

In der mit dem *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukt transfizierten NF54-WT-Kultur konnten bereits ca. 30 Tage nach erfolgter positiver Selektion erneut viable Parasiten beobachtet werden. Die Verifizierung der Integration des transfizierten *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukts wurde anhand von spezifischen Oligonukleotiden in einer diagnostischen PCR überprüft. Zum Integrationsnachweis wurden die Oligonukleotide pCAM-*Sense* und *PfFNPA*-wt2-*Antisense* (Produktgröße: 847 bp) verwendet. Zusätzlich konnte mit einem anderen Oligonukleotidpaar pCAM-*Antisense*-2 und *PfFNPA*-wt4-*Sense* (Produktgröße: 699 bp), ein weiterer Integrationsnachweis erbracht werden. Die diagnostische PCR unter Verwendung dieser beiden Oligonukleotide ist von Frau Dipl. Biol. Andrea Kühn durchgeführt worden und wurde der Vollständigkeit halber hier mit aufgeführt. Parallel dazu wurde die Zerstörung des *PfFNPA*-WT-Locus anhand der Oligonukleotide *PfFNPA*-wt4-*Sense* und *PfFNPA*-wt2-*Antisense* (Produktgröße: 794 bp) überprüft. Episomaler Vektor wurde mit den für den pCAM-BSD-KO-Vektor spezifischen Oligonukleotiden pCAM-*Sense*2 und pCAM-*Antisense* (Produktgröße: 710 bp) nachgewiesen. Die diagnostische PCR zeigte eine stabile, reproduzierbare Integration und damit eine erfolgreiche *PfFNPA*-Genspaltung im Bereich der homologen Region des *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukts (Abb. 3.18).

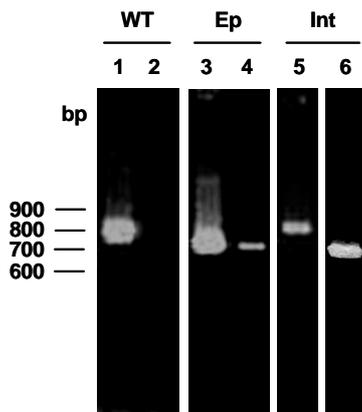


Abb. 3.18. Diagnostische PCR zur Überprüfung der Integration des *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukts. Ein 847-bp-großes PCR-Produkt in Spur 5 sowie eine 699-bp-großes PCR-Produkt in Spur 6 bestätigte die Integration des *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukts in den *PfFNPA*-WT-Locus. Das 794-bp-große Produkt in Spur 1 (Positivkontrolle; gDNA von WT-Parasiten) sowie das Fehlen des Produkts in Spur 2 (gDNA der *PfFNPA*-BSD-KO2-Parasitenkultur) diente dem Nachweis der Abwesenheit des WT-Locus. Das 710-bp-große Produkt in Spur 3 (Positivkontrolle; pCAM-Plasmid mit kloniertem *PfFNPA*-BSD-KO2-Fragment) und Spur 4 (gDNA der *PfFNPA*-BSD-KO2-Parasitenkultur) diente dem Nachweis von nicht integriertem, episomalem Vektor. WT, Wildtyp-PCR; Ep, Episomale-PCR; Int, Integrations-PCR.

Zur Überprüfung der Expression des *PfFNPA*-Proteins in *PfFNPA*-BSD-KO2-Parasiten wurden nachfolgend Western-Blot- und indirekte Immunfluoreszenz-Analysen (siehe Kapitel 2.2.1.9 und 2.2.3.5) durchgeführt. Die von Frau Dipl. Biol. Andrea Kühn angefertigten Expressionsstudien unter Verwendung der polyklonalen Mausseren anti-*PfFNPA*Arp1, gerichtet gegen das noch zu exprimierende *PfFNPA*-Fragment, und anti-*PfFNPA*Arp2 zeigten hierbei eine fehlende *PfFNPA*-Expression in Gametozyten des *PfFNPA*-BSD-KO2-Klons 1H4 (Abb. 3.19 A und B; Simon *et al.*, 2009).

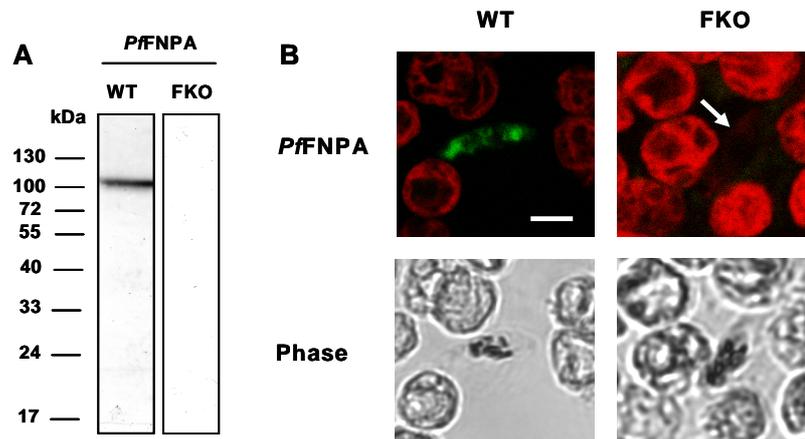


Abb. 3.19. Expressionsstudien von *PfFNPA* in Gametozyten des *PfFNPA*-BSD-KO2-Klons 1H4. A. Western-Blot-Analysen unter Verwendung von polyklonalem Mausserum, gerichtet gegen das noch zu exprimierende *PfFNPA*-Fragment, zeigten eine mangelnde *PfFNPA*-Expression in *PfFNPA*-BSD-KO2-Gametozyten. WT, NF54-Wildtyp-Kontrolle; FKO, *PfFNPA*-BSD-KO2-Klon 1H4; *PfFNPA*, 100 kDa. B. Immunfluoreszenzstudien detektierten keine Expression von *PfFNPA* (in Grün) in *PfFNPA*-BSD-KO2-Gametozyten. Der Pfeil markiert die Lage des KO-Gametozyten. WT, NF54-Wildtyp-Kontrolle; FKO, *PfFNPA*-BSD-KO2-Klon 1H4; Phase, Phasenkontrast; Größenangabe, 4  $\mu$ m. Quelle: Simon *et al.*, 2009, verändert.

### 3.1.3.2 Verifizierung von *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Komplementations-Parasiten

Mit Hilfe der Transfektion der *PfCCp5*-Comp1- und -Comp2-Konstrukte sowie des *PfFNPA*-Comp2-Konstrukts (siehe Kapitel 2.2.1.8) sollte zusätzlich getestet werden, ob die *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Loci für genetische Manipulationen zugänglich sind. Hierfür wurden ca. 500-bp-große Fragmente (*PfCCp5*-Comp1, -Comp2 und *PfFNPA*-Comp) aus dem 3'-Ende der translatierten Region beider Gene in den pCAM-BSD-Comp-Vektor kloniert und in NF54-WT-Parasiten transfiziert. Unter Verwendung dieses Vektors bleibt bei erfolgter Integration der Konstrukte die Funktionsfähigkeit der Gene vollständig erhalten und die korrekte Expression kann mittels eines spezifisch gegen das HA-Tag gerichteten Antikörpers analysiert werden.

Nach Isolation von genomischer DNA aus den transfizierten und anschließend positiv selektierten Kulturen wurde mittels diagnostischer PCR auf Integration getestet. Für den Integrationsnachweis am 3'-Ende der *PfCCp5*-Comp1- und -Comp2-Konstrukte wurden die Oligonukleotide pCAMcomp-HA-*Antisense* und *PfCCp5*-wt2-*Sense* (Produktgröße: 802 bzw. 758 bp) sowie die Oligonukleotide pCAMcomp-*Antisense* und *PfCCp5*-wt2-*Sense* (Produktgröße: 1824 bzw. 1780 bp) verwendet. Die Präsenz des *PfCCp5*-WT-Locus wurde anhand der Oligonukleotide *PfCCp5*-wt2-*Sense* und *PfCCp5*-3'UTR-wt2-*Antisense* (Produktgröße: 796 bp) überprüft. Episomaler Vektor wurde mit den Oligonukleotiden pCAMcomp-seq2-*Sense* und pCAMcomp-*Antisense* (Produktgröße: 1754 bzw. 1710 bp) nachgewiesen. Der Integrationsnachweis des *PfFNPA*-Comp-Konstrukts wurde anhand der Oligonukleotide pCAMcomp-HA-*Antisense* und *PfFNPA*-wt5-*Sense* (Produktgröße: 642 bp) sowie der Oligonukleotide pCAMcomp-*Antisense* und *PfFNPA*-wt5-*Sense* (Produktgröße: 1664 bp) erbracht. Der Test auf das Vorhandensein des *PfFNPA*-WT-Locus wurde unter Verwendung der Oligonukleotide *PfFNPA*-wt5-*Sense* und *PfFNPA*-3'UTR-wt3-*Antisense* (Produktgröße: 652 bp) überprüft. Anhand der Oligonukleotide pCAMcomp-seq2-*Sense* und pCAMcomp-*Antisense* (Produktgröße: 1715 bp) konnte episomaler Vektor amplifiziert werden. Sowohl für die beiden *PfCCp5*-Comp-Konstrukte als auch für das *PfFNPA*-Comp-Konstrukt konnte erfolgreich eine stabile, homologe *single-crossover*-Rekombination in den WT-Locus der beiden Proteine gezeigt werden (Abb. 3.20).

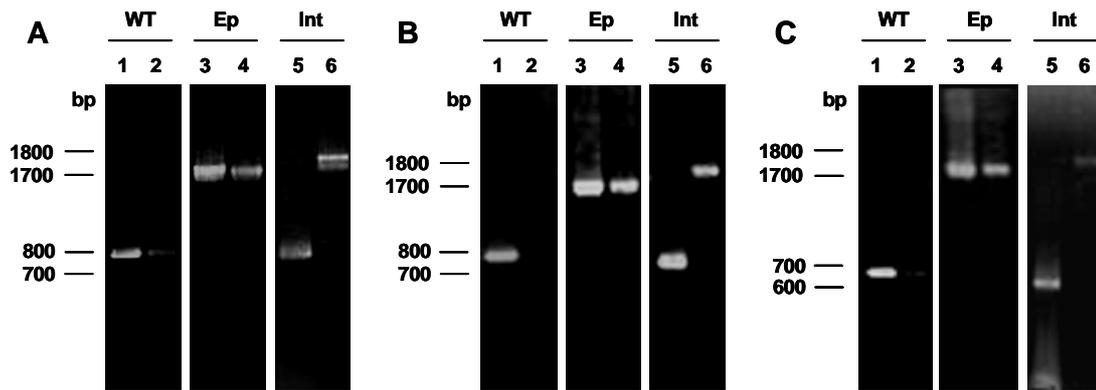


Abb. 3.20. Diagnostische PCR zur Überprüfung der Integration der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Comp-Konstrukte. (A) Ein 802-bp-großes PCR-Produkt in Spur 5 sowie eine 1780-bp-großes PCR-Produkt bestätigte die Integration des *PfCCp5*-Comp1-Konstrukts in den *PfCCp5*-WT-Locus. Das 796-bp-große Produkt in Spur 1 (Positivkontrolle; gDNA von WT-Parasiten) sowie in Spur 2 (gDNA der *PfCCp5*-Comp1-Parasitenkultur) diente dem Nachweis der Präsenz des WT-Locus. Das 1754-bp-große Produkt in Spur 3 (Positivkontrolle; pCAM-Comp-Plasmid mit kloniertem *PfCCp5*-Comp1-Fragment) und Spur 4 (gDNA der *PfCCp5*-Comp1-Parasitenkultur) diente dem Nachweis von episomalem Vektor. (B) *PfCCp5*-Comp2-Integrationsnachweis in den *PfCCp5*-WT-Locus in Spur 5 (758 bp) und in Spur 6 (1824 bp). Das 796-bp-große Produkt in Spur 1 (gDNA von WT-Parasiten) bzw. in Spur 2 (gDNA der *PfCCp5*-Comp2-Parasitenkultur) diente dem Nachweis der WT-Locus-Präsenz. Das 1710-bp-große Produkt in Spur 3 (pCAM-Comp-Plasmid mit kloniertem *PfCCp5*-Comp2-Fragment) und Spur 4 (gDNA der *PfCCp5*-Comp2-Parasitenkultur) diente dem Nachweis von episomalem Vektor. (C) Nachweis der *PfFNPA*-Comp-Integration in den *PfFNPA*-WT-Locus in Spur 5 mittels eines 642-bp-großen und in Spur 6 mittels eines 1664-bp-großen Produktes. Nachweis der *PfFNPA*-WT-Locus-Präsenz in Spur 1 (gDNA von WT-Parasiten) sowie in Spur 2 (gDNA der *PfFNPA*-Comp-Parasitenkultur) anhand eines 652-bp-großen Produktes. Kontrolle der Anwesenheit des episomalen Vektors in Spur 3 (pCAM-Comp-Plasmid mit kloniertem *PfFNPA*-Comp-Fragment) und Spur 4 (gDNA der *PfFNPA*-Comp-Parasitenkultur) durch ein 1715-bp-großes Produkt.

## 3.2 Funktionelle Charakterisierung von *PfCCp5* und *PfFNPA* mittels Interaktionsstudien

### 3.2.1 Ko-abhängige Expression der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine

Im Zuge der funktionellen Charakterisierung des *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteins wurden ko-abhängige Expressionsstudien in *PfCCp1*- bis *PfCCp4*-KO-Klonen durchgeführt. Anlass hierfür war eine Veröffentlichung von Pradel *et al.* im Jahre 2006, in der eine fehlende Expression von *PfCCp1* und *PfCCp2* in den *PfCCp3*-KO-Klonen H3D und I9C, trotz unverändertem Transkriptlevels, gezeigt werden konnte. Des

Weiteren schien auch die Proteinexpression von *PfCCp1* und *PfCCp3* in den beiden *PfCCp2*-KO-Klonen D11H und F1D reduziert zu sein. Die ko-abhängige Expression und die Ko-Lokalisation von *PfCCp1* bis *PfCCp3* sowie deren teilweise Freisetzung während der Gamogonie von NF45-WT-Parasiten verbunden mit einer matrixähnlichen Anordnung um entstehende Exflagellationszentren gaben erste Anhaltspunkte für eine mögliche weit reichende Interaktion der *PfCCp*-Proteine in den Sexualstadien von *P. falciparum*. Eine mögliche ko-abhängige Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* wurde unter Verwendung von Gametozytenlysaten des *PfCCp1*-KO-Klons 5YE2 (Simon *et al.*, 2009), des *PfCCp2*-KO-Klons F1D sowie des *PfCCp3*-KO-Klons I9C (Pradel *et al.*, 2004) und des erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe charakterisierten *PfCCp4*-KO-Klons L4C (Scholz *et al.*, 2008) mittels Western-Blot-Analysen untersucht. In Gametozytenlysaten der *PfCCp1*-, *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Klone konnten keine *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteinexpression beobachtet und somit eine mögliche ko-abhängige Expression dargestellt werden (Abb. 3.21). Ein Vergleich der Proteinbanden von *PfCCp5* und *PfFNPA* in WT- und in *PfCCp4*-KO-Gametozytenlysaten zeigte eine verminderte Expression beider Proteine in *PfCCp4*-KO-Gametozyten. Immundetektion unter Verwendung von Antiseren gegen das ER-assoziierte *Pf39*-Protein (39 kDa) diente hierbei der Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung aller Gelspuren. Darüber hinaus wurden - zur Verifizierung der mittels Western Blot gezeigten mutmaßlichen ko-abhängigen Expression - von *PfCCp5* sowie von *PfFNPA* in den *PfCCp1*- bis *PfCCp4*-KO-Klonen indirekte Immunfluoreszenz-Analysen an Gametozyten der entsprechenden KO-Parasitenstämme durchgeführt. Die Immunfluoreszenz-Analysen unter Verwendung von Gametozyten des *PfCCp1*-KO-Klons 5YE2 sowie des NF-WT-Stammes als Kontrolle bestätigten die im Western Blot erhaltenen Resultate. Eine Doppelmarkierung mit polyklonalen Mäuseren gegen *PfCCp5* und *PfFNPA* sowie mit Kaninchenseren gegen *Pfs25* (ATCC; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990) ließ ein vollständiges Fehlen von *PfCCp5* sowie *PfFNPA* im *PfCCp1*-KO-Klon 5YE2 erkennen (Abb. 3.22 und 3.23). Eine ko-abhängige Expression des im Zytoplasma inaktivierter Gametozyten vesikulär lokalisierenden *Pfs25*-Proteins (Scholz *et al.*, 2008) von *PfCCp1* war hingegen nicht feststellbar.

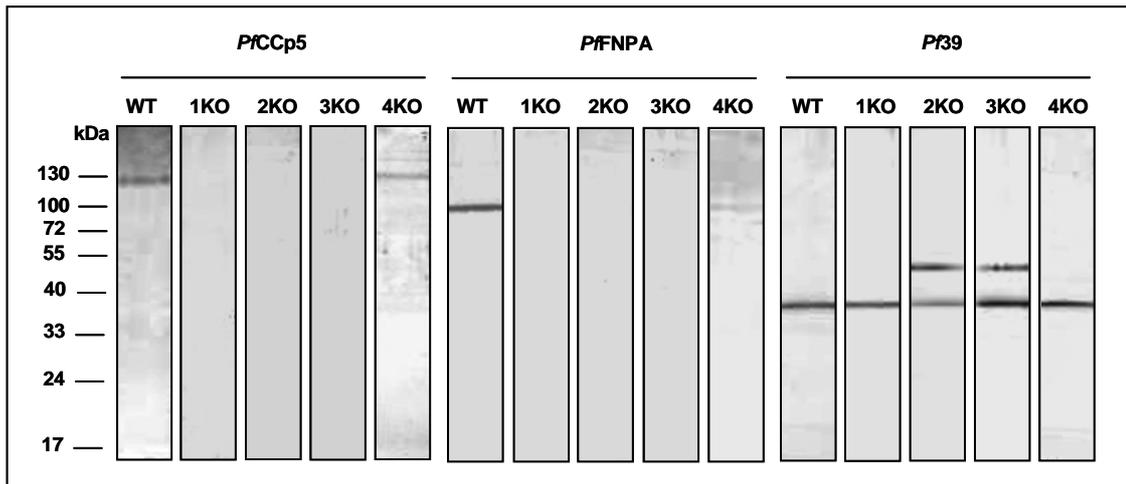


Abb. 3.21. Untersuchung der ko-abhängigen *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Expression anhand von Western-Blot-Analysen. Polyklonale Mausseren gegen *PfCCp5* und *PfFNPA* zeigten eine ko-abhängige Expression der beiden Proteine in Gametozytenlysat der Klone 5YE2 (*PfCCp1*-KO), F1D (*PfCCp2*-KO) und I9C (*PfCCp3*-KO). Eine verringerte Expression von *PfCCp5* bzw. von *PfFNPA* war auch in Gametozytenlysat des L4C-Klons (*PfCCp4*-KO) detektierbar. Polyklonales Mausserum gegen *Pf39* (39 kDa) diente der Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung. WT, NF54-Wildtyp-Kontrolle; KO, *knockout*-Stamm; *PfCCp5*, 125 kDa; *PfFNPA*, 100 kDa.

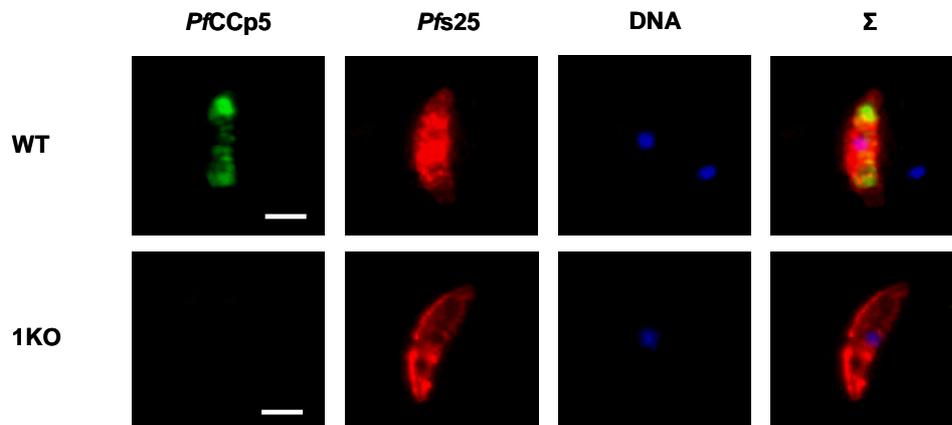


Abb. 3.22. *PfCCp1*-abhängige Expression von *PfCCp5*. Immunfluoreszenzstudien deckten für *PfCCp5* (in Grün) in Gametozyten des *PfCCp1*-KO-Klons 5YE2 ein vollständiges Fehlen der Expression von *PfCCp5* auf, während für intrazelluläres *Pfs25* (in Rot) eine von *PfCCp1*-unabhängige Expression gezeigt werden konnte. Blau, Kernmaterial angefärbt mit *Hoechst Nuclear Stain*;  $\Sigma$ , Überlagerung der Einzelbilder; Größenangabe, 2  $\mu\text{m}$ .

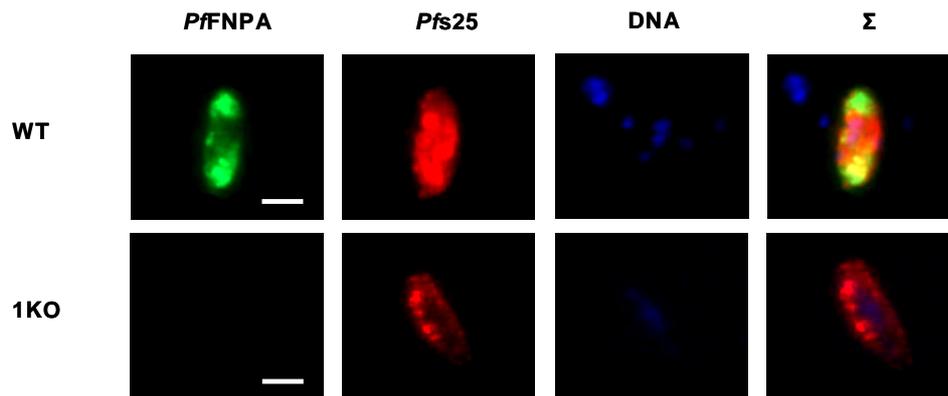


Abb. 3.23. *PfCCp1*-abhängige Expression von *PfFNPA*. Immunfluoreszenzstudien wiesen für *PfFNPA* (in Grün) in Gametozyten des *PfCCp1*-KO-Klons 5YE2 ebenfalls ein vollständiges Fehlen der *PfFNPA*-Expression nach. Rot, *Pfs25*; Blau, Kernmaterial angefärbt mit *Hoechst Nuclear Stain*;  $\Sigma$ , Überlagerung der Einzelbilder; Größenangabe, 2  $\mu\text{m}$ .

Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung von Gametozyten des *PfCCp2*-KO-Klons F1D, des *PfCCp3*-KO-Klons I9C und des *PfCCp4*-KO-Klons L4C bekräftigten ebenfalls die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen. Ein Vergleich der Signale von *PfCCp5* und *PfFNPA* in NF54-WT- mit den Signalen in *PfCCp2*-KO- sowie *PfCCp3*-KO-Gametozyten zeigte ein nahezu vollständiges Fehlen der Expression beider Proteine in den zwei KO-Stämmen. In Gametozyten des *PfCCp4*-KO-Klons L4C war dagegen, wie bereits in den oben gezeigten Western-Blot-Analysen, lediglich eine Reduktion der Expression von *PfCCp5* sowie *PfFNPA* feststellbar (Abb. 3.24).

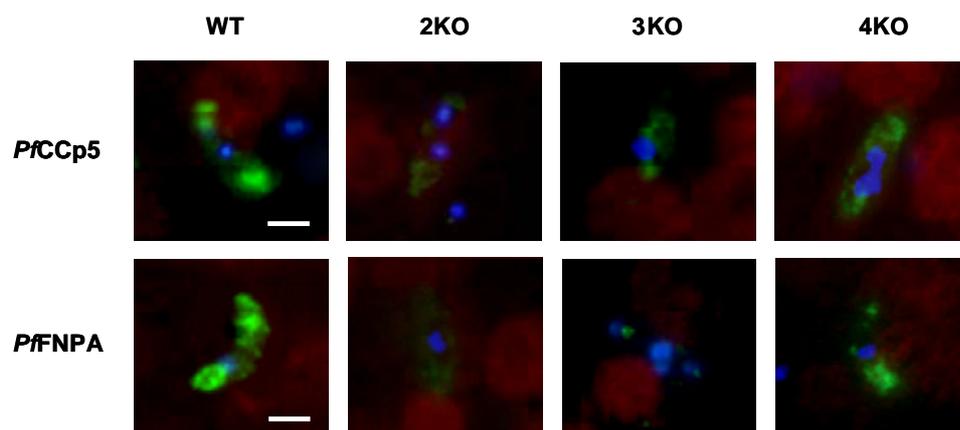


Abb. 3.24. Expressionsanalysen von *PfCCp5* und *PfFNPA* in *PfCCp2*- bis 4-KO-Gametozyten. Immunfluoreszenzstudien wiesen sowohl für *PfCCp5* (in Grün, obere Reihe) als auch für *PfFNPA* (in Grün, untere Reihe) ein nahezu vollständiges Fehlen der Expression in Gametozyten der *PfCCp2*- und 3-KO-Parasitenstämmen nach. In Gametozyten des *PfCCp4*-KO-Parasitenstammes war hingegen lediglich eine Reduktion der Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* feststellbar. WT, NF54-Wildtyp-Kontrolle; Rot, Gegenfärbung der Erythrozyten mit *Evans Blue*; Blau, Kernmaterial angefärbt mit *Hoechst Nuclear Stain*; Größenangabe, 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Ko-Immünpräzipitationsstudien

Für *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* konnten bereits Interaktionen dieser Proteine während der Reifung der Gametozyten und der anschließenden Gametogenese gezeigt werden (Pradel *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2006). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass diese drei Proteine *in vitro* während des Ausbrechens der Gametozyten aus den Erythrozyten partiell freigesetzt werden und im Verlauf der Gametogenese entstehende Exflagellationskomplexe matrixähnlich umgeben. Diese Befunde sowie die in Kapitel 3.2.1 gezeigte ko-abhängige Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* regten zu einer detaillierten Untersuchung möglicher Interaktionen nativer *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine mit den anderen Proteinen der *PfCCp*-Familie mittels Ko-Immünpräzipitationsstudien an. Bei einer Ko-Immünpräzipitation werden spezifisch an das zu untersuchende Protein bindende Antikörper (Köder) einem Proteingemisch beigefügt. Durch anschließende Zugabe von ProteinG-*beads* können dann das zu untersuchende Protein sowie mögliche Interaktionspartner (Beute) aus dem Probengemisch präzipitiert werden. Zu diesem Zweck wurde NF54-WT-Gametozytenlysat zunächst mit neutralem Mausserum vorgereinigt und im Anschluss mit polyklonalen Mausseren gegen *PfCCp5* oder *PfFNPA* versetzt (siehe Kapitel 2.2.3.6). Nach erfolgter Präzipitation mit Hilfe von ProteinG-*beads* wurde das Protein-Präzipitat durch SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung von Antiseren gegen *PfCCp1* bis *PfCCp4* analysiert. Als Negativkontrollen wurden Ko-Immünpräzipitationen unter Verwendung von polyklonalem Mausserum gegen das ER-assoziierte Protein *Pf39* (Templeton *et al.*, 1997) durchgeführt, welches aufgrund seiner Lokalisation nicht mit Proteinen der parasitophoren Vakuole interagieren sollte. Als Positivkontrolle wurden Ko-Immünpräzipitationen und anschließend Western-Blot-Analysen durchgeführt, in denen das zur Bindung an die ProteinG-*beads* und das zur Detektierung verwendete polyklonale Mausserum (Anti-*PfCCp5/5rp2* bzw. Anti-*PfFNPA/FNPArp2*) identisch war. Diese Positivkontrolle diente dem Nachweis der Anwesenheit der Köderproteine *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine im jeweiligen Präzipitat.

Anhand von Western-Blot-Analysen konnte eine Interaktion von nativem *PfCCp5* mit nativem *PfCCp1*, *PfCCp2*, *PfCCp3* und *PfFNPA* detektiert werden (Abb. 3.25 A). Ebenso konnte eine Interaktion von nativem *PfFNPA* mit nativem *PfCCp1*, *PfCCp2*, *PfCCp3* und *PfCCp5* dargestellt werden (Abb. 3.25 B). Eine Interaktion von *PfCCp5* bzw. *PfFNPA* mit *PfCCp4* ließ sich aufgrund der geringen Effizienz des *PfCCp4*-Antiserums im Western Blot nicht nachweisen. Deshalb wurde eine weitere Ko-Immünpräzipitation unter Verwendung von polyklonalem Mausserum gegen *PfCCp4* durchgeführt und anschließend im Western Blot mit den Mausseren anti-*PfCCp5* sowie anti-*PfFNPA* detektiert. Durch Präzipitation mit *PfCCp4*-Antiserum war es möglich, eine

deutliche Interaktion von nativem *PfFNPA*- sowie eine sehr schwache Interaktion von nativem *PfCCp5*-Protein mit *PfCCp4* nachzuweisen (Abb. 3.26). Als Negativkontrolle diente hier ebenfalls die Immundetektion anhand von Antiseren, die sich gegen das *Pf39*-Protein richteten. Als weitere Negativkontrolle wurde eine Immunpräzipitation unter Verwendung von 1 x PBS anstatt des Primärantikörpers verwendet und nachfolgend im Western Blot mit Antiseren gegen *PfCCp1* detektiert.

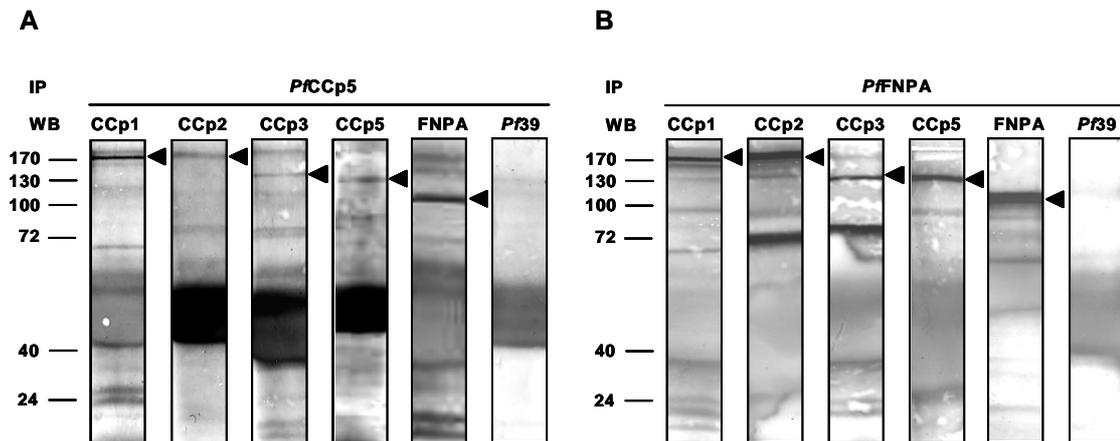


Abb. 3.25. Ko-Immünpräzipitationen mit *PfCCp5* und *PfFNPA* als Köder. A. Unter Verwendung von polyklonalem *PfCCp5*-Antiserum konnte mittels Ko-Immünpräzipitationsstudien (IP) an NF54-WT-Gametozytenlysat und nachfolgender Western-Blot-Analysen (WB) eine Interaktion von nativem *PfCCp5* mit nativem *PfCCp1* (185 kDa), *PfCCp2* (185 kDa), *PfCCp3* (150 kDa) sowie *PfFNPA* (100 kDa) nachgewiesen werden. Eine Interaktion von *PfCCp5* mit dem *Pf39*-Protein wurde im Western Blot hingegen nicht detektiert. B. Anhand von Ko-Immünpräzipitationsstudien (IP) an NF54-WT-Gametozytenlysat unter Verwendung von polyklonalem *PfFNPA*-Antiserum konnte mittels Western-Blot-Analyse (WB) ebenso eine Interaktion von nativem *PfFNPA* mit nativem *PfCCp1* (185 kDa), *PfCCp2* (185 kDa), *PfCCp3* (150 kDa) sowie *PfCCp5* (125 kDa) nachgewiesen werden. Eine Interaktion von *PfFNPA* mit dem *Pf39*-Protein wurde im Western Blot ebenfalls nicht detektiert. Schwarze Pfeile, Kennzeichnung der erwarteten molekularen Masse der mit *PfCCp5* bzw. *PfFNPA* interagierenden *PfCCp*-Proteine.

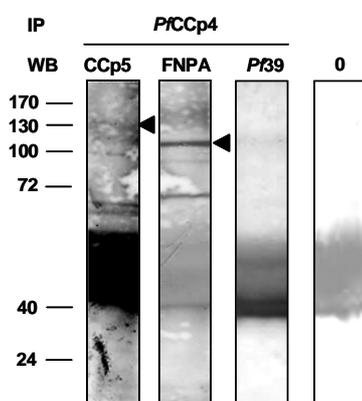


Abb. 3.26. Ko-Immünpräzipitation mit *PfCCp4* als Köder. Mittels Ko-Immünpräzipitationsstudien (IP) an NF54-WT-Gametozytenlysat unter Verwendung von polyklonalem *PfCCp4*-Antiserum konnte im Western Blot (WB) eine Interaktion von nativem *PfCCp4* mit nativem *PfFNPA* (100 kDa) sowie mit nativem *PfCCp5* (125 kDa) nachgewiesen werden. Eine Interaktion von *PfCCp4* mit dem *Pf39*-Protein war, wie erwartet, nicht nachweisbar. 0, Negativkontrolle IP mit polyklonalem Mausserum gegen *PfCCp1*, ohne Verwendung eines Primärantikörpers im Western Blot.

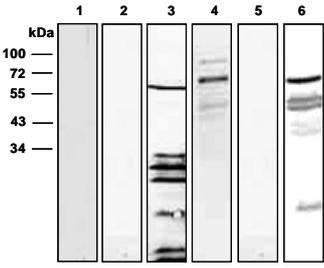
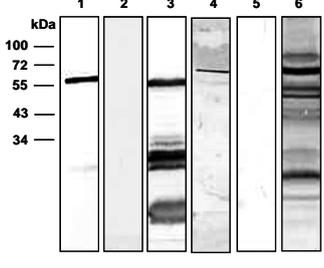
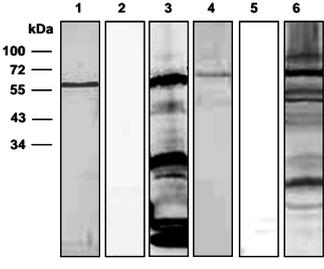
### 3.2.3 Affinitätschromatographiestudien

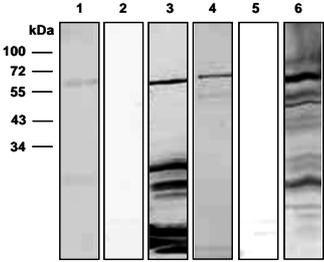
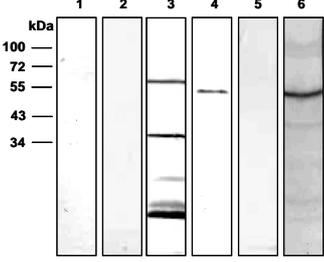
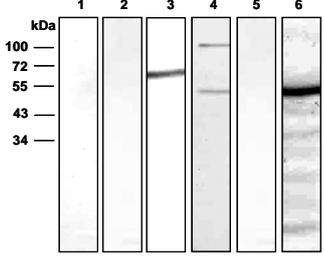
Eine weitere Konsequenz der ko-abhängigen Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* war eine detaillierte Untersuchung möglicher direkter Interaktionen einzelner *PfCCp*-Domänen mittels Affinitätschromatographien (siehe Kapitel 2.2.3.7). Hierzu wurden ausgewählte rekombinante, domänenüberspannende *PfCCp*-Proteine (*PfCCp1rp1*, *PfCCp3rp1*, *PfCCp3rp3* sowie *PfCCp3rp4*), welche in unserem Labor als GST-Fusionsprotein kloniert wurden, exprimiert.

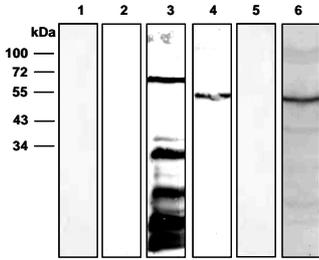
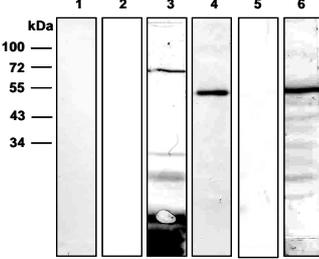
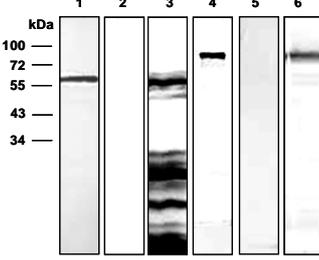
Nach erfolgter Überexpression wurden die GST-Fusionsproteine (Köder) an Glutathion-Sepharose gebunden und auf eine PolyPrep<sup>®</sup>-Säule appliziert. Ungebundene Proteine wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS ausgespült und die ebenfalls überexprimierten, potentiellen 6His/SUMO-fusionierten Interaktionspartner (Beute: *PfCCp5rp1*, *PfCCp5rp2*, *PfFNPArp1* bzw. *PfFNPArp2*) wurden danach hinzu gegeben. Der ungebundene Durchfluss dieser beiden Proteingemische wurde für die spätere Analyse einer ausreichenden Expression des jeweiligen GST- bzw. 6His/SUMO-Fusionsproteines aufgefangen und mittels Western Blot analysiert. Durch nachfolgendes mehrmaliges Waschen mit 1 x PBS wurden die 6His/SUMO-fusionierten rekombinanten Proteine bei ausbleibender Interaktion ausgespült. Zur Kontrolle einer vollständigen Entfernung ungebundener GST- bzw. 6His/SUMO-Fusionsproteine nach dem letzten Waschschrift wurde dieser aufgefangen und auf die Abwesenheit des jeweiligen GST- bzw. 6His/SUMO-Fusionsproteins ebenfalls mittels Western Blot analysiert. Bei einer Interaktion wurden die GST- und 6His/SUMO-Fusionsproteine indessen nachfolgend ko-eluiert und waren mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse im Eluat detektierbar.

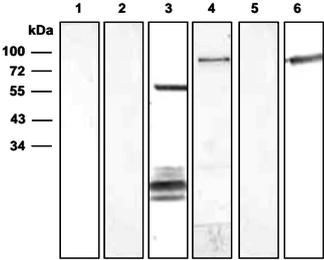
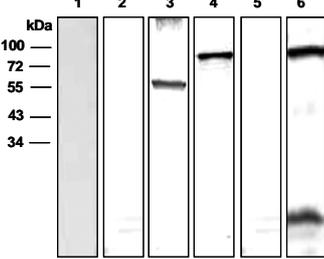
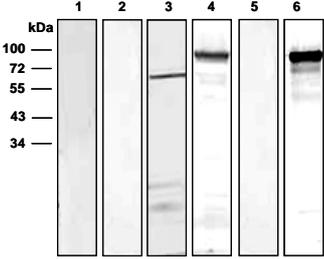
In Tab. 3.2 sind sämtliche angefertigten Interaktionsstudien unter Verwendung rekombinanter, 6His/SUMO-fusionierter *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine aufgeführt. Die Affinitätschromatographien anhand von rekombinantem, GST-fusioniertem *PfCCp3rp1*-Protein waren bereits von Herrn Dipl. Biol. Roland Frank durchgeführt worden und wurden, der Vollständigkeit halber, mit in die vorliegende Arbeit aufgenommen. Als Negativkontrolle, zur Überprüfung der Reinheit, wurde jeweils der letzte Waschschrift (W) im Western Blot analysiert. Um bei fehlender Interaktion eine mangelnde Expression auszuschließen, wurde der Durchfluss (D) der überexprimierten GST- sowie der 6His/SUMO-Fusionsproteine als Positivkontrolle mitgeführt. Das Eluat (E) wurde mittels Antiseren gerichtet gegen das 6His- bzw. das GST-Fragment auf Ko-Elution überprüft.

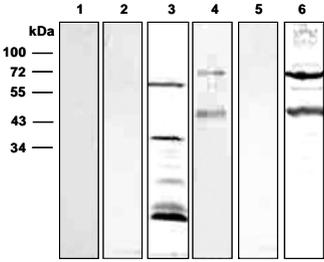
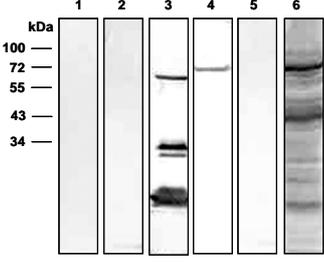
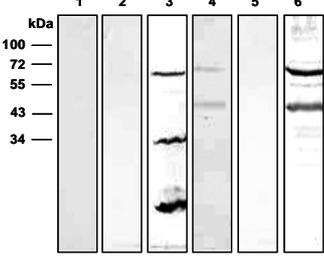
Tab. 3.2. Western-Blot-Analysen der Affinitätschromatographiestudien zur Untersuchung direkter Interaktionen zwischen rekombinanten, 6His/SUMO-fusionierten *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteinen mit potentiellen GST-fusionierten *PfCCp*-Interaktionspartnern (+, Interaktion; -, keine Interaktion nachweisbar)

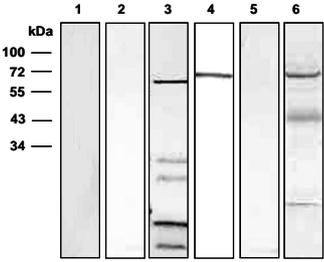
Köder GST- Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrolle		Inter- aktion	
<i>PfCCp1rp1</i> (66 kDa)	<i>PfCCp5rp1</i> (53 kDa)			<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1rp1-G x 5rp1-H, E</li> <li>1rp1-G x 5rp1-H, W</li> <li>5rp1-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1rp1-G x 5rp1-H, E</li> <li>1rp1-G x 5rp1-H, W</li> <li>1rp1-G, D</li> </ol>	-
<i>PfCCp1rp1</i> (66 kDa)	<i>PfCCp5rp2</i> (60 kDa)			<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1rp1-G x 5rp2-H, E</li> <li>1rp1-G x 5rp2-H, W</li> <li>5rp2-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1rp1-G x 5rp2-H, E</li> <li>1rp1-G x 5rp2-H, W</li> <li>1rp1-G, D</li> </ol>	+
<i>PfCCp1rp1</i> (66 kDa)	<i>PfFNPArp1</i> (56 kDa)			<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1rp1-G x Frp1-H, E</li> <li>1rp1-G x Frp1-H, W</li> <li>Frp1-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1rp1-G x Frp1-H, E</li> <li>1rp1-G x Frp1-H, W</li> <li>1rp1-G, D</li> </ol>	+

Köder GST- Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrolle	Inter- aktion	
<i>PfCCp1rp1</i> (66 kDa)	<i>PfFNPArp2</i> (64 kDa)		<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1rp1-G x Frp2-H, E</li> <li>1rp1-G x Frp2-H, W</li> <li>Frp2-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1rp1-G x Frp2-H, E</li> <li>1rp1-G x Frp2-H, W</li> <li>1rp1-G, D</li> </ol>	+
<i>PfCCp3rp1</i> (53 kDa)	<i>PfCCp5rp1</i> (53 kDa)		<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp1-G x 5rp1-H, E</li> <li>3rp1-G x 5rp1-H, W</li> <li>5rp1-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp1-G x 5rp1-H, E</li> <li>3rp1-G x 5rp1-H, W</li> <li>3rp1-G, D</li> </ol>	-
<i>PfCCp3rp1</i> (53 kDa)	<i>PfCCp5rp2</i> (60 kDa)		<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp1-G x 5rp2-H, E</li> <li>3rp1-G x 5rp2-H, W</li> <li>5rp2-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp1-G x 5rp2-H, E</li> <li>3rp1-G x 5rp2-H, W</li> <li>3rp1-G, D</li> </ol>	-

Köder GST- Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrolle	Inter- aktion	
<i>PfCCp3rp1</i> (53 kDa)	<i>PfFNPArp1</i> (56 kDa)		<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp1-G x Frp1-H, E</li> <li>3rp1-G x Frp1-H, W</li> <li>Frp1-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp1-G x Frp1-H, E</li> <li>3rp1-G x Frp1-H, W</li> <li>3rp1-G, D</li> </ol>	—
<i>PfCCp3rp1</i> (53 kDa)	<i>PfFNPArp2</i> (64 kDa)		<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp1-G x Frp2-H, E</li> <li>3rp1-G x Frp2-H, W</li> <li>Frp2-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp1-G x Frp2-H, E</li> <li>3rp1-G x Frp2-H, W</li> <li>3rp1-G, D</li> </ol>	—
<i>PfCCp3rp3</i> (77 kDa)	<i>PfCCp5rp1</i> (53 kDa)		<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp3-G x 5rp1-H, E</li> <li>3rp3-G x 5rp1-H, W</li> <li>5rp1-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp3-G x 5rp1-H, E</li> <li>3rp3-G x 5rp1-H, W</li> <li>3rp3-H, D</li> </ol>	+

Köder GST- Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrolle	Inter- aktion	
<p><i>PfCCp3rp3</i> (77 kDa)</p>	<p><i>PfCCp5rp2</i> (60 kDa)</p>		<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp3-G x 5rp2-H, E</li> <li>3rp3-G x 5rp2-H, W</li> <li>5rp2-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp3-G x 5rp2-H, E</li> <li>3rp3-G x 5rp2-H, W</li> <li>3rp3-H, D</li> </ol>	<p>—</p>
<p><i>PfCCp3rp3</i> (77 kDa)</p>	<p><i>PfFNPArp1</i> (56 kDa)</p>		<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp3-G x Frp1-H, E</li> <li>3rp3-G x Frp1-H, W</li> <li>Frp1-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp3-G x Frp1-H, E</li> <li>3rp3-G x Frp1-H, W</li> <li>3rp3-H, D</li> </ol>	<p>—</p>
<p><i>PfCCp3rp3</i> (77 kDa)</p>	<p><i>PfFNPArp2</i> (64 kDa)</p>		<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp3-G x Frp2-H, E</li> <li>3rp3-G x Frp2-H, W</li> <li>Frp2-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3rp3-G x Frp2-H, E</li> <li>3rp3-G x Frp2-H, W</li> <li>3rp3-H, D</li> </ol>	<p>—</p>

Köder GST- Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrolle		Inter- aktion	
<p><i>PfCCp3rp4</i> (72 kDa)</p>	<p><i>PfCCp5rp1</i> (53 kDa)</p>			<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 3rp4-G x 5rp1-H, E</li> <li>2. 3rp4-G x 5rp1-H, W</li> <li>3. 5rp1-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. 3rp4-G x 5rp1-H, E</li> <li>5. 3rp4-G x 5rp1-H, W</li> <li>6. 3rp4-H, D</li> </ol>	<p>—</p>
<p><i>PfCCp3rp4</i> (72 kDa)</p>	<p><i>PfCCp5rp2</i> (60 kDa)</p>			<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 3rp4-G x 5rp2-H, E</li> <li>2. 3rp4-G x 5rp2-H, W</li> <li>3. 5rp2-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. 3rp4-G x 5rp2-H, E</li> <li>5. 3rp4-G x 5rp2-H, W</li> <li>6. 3rp4-H, D</li> </ol>	<p>—</p>
<p><i>PfCCp3rp4</i> (72 kDa)</p>	<p><i>PfFNPArp1</i> (56 kDa)</p>			<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 3rp4-G x Frp1-H, E</li> <li>2. 3rp4-G x Frp1-H, W</li> <li>3. Frp1-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. 3rp4-G x Frp1-H, E</li> <li>5. 3rp4-G x Frp1-H, W</li> <li>6. 3rp4-H, D</li> </ol>	<p>—</p>

Köder GST- Protein (G)	Beute 6His/SUMO- Protein (H)	Blot und Expressionskontrolle		Inter- aktion	
<i>PfCCp3rp4</i> (72 kDa)	<i>PfFNPArp2</i> (64 kDa)			<p><b>Anti-His-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 3rp4-G x Frp2-H, E</li> <li>2. 3rp4-G x Frp2-H, W</li> <li>3. Frp2-H, D</li> </ol> <p><b>Anti-GST-Blot</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. 3rp4-G x Frp2-H, E</li> <li>5. 3rp4-G x Frp2-H, W</li> <li>6. 3rp4-H, D</li> </ol>	—

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit direkte Interaktionen zwischen rekombinatem, GST-fusioniertem *PfCCp1rp1*-Protein und rekombinatem, 6His/SUMO-fusioniertem *PfCCP5rp2*-, *PfFNPArp1*- sowie *PfFNPArp2*-Protein nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte eine direkte Interaktion von rekombinatem, GST-fusioniertem *PfCCp3rp3*-Protein und rekombinatem, 6His/SUMO-fusioniertem *PfCCP5rp1*-Protein aufgedeckt werden. Bei einigen Western-Blot-Analysen der oben gezeigten Interaktionsstudien traten neben den Proteinbanden mit der erwarteten molekularen Masse zusätzliche niedermolekulare Banden auf. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen mit den jeweiligen verkürzten, nicht vollständig exprimierten rekombinanten Proteinen. Die hier dargestellten Affinitätschromatographiestudien waren Teil einer in unserem Labor erstellten umfassenden Analyse möglicher Interaktionen rekombinanter *PfCCp*-Proteine (Simon *et al.*, 2009).

### 3.3 Test der Inhibitoren auf antiplasmodiale Aktivität

#### 3.3.1 Validierung der Testbedingungen mit Chloroquin

Immer zahlreichere Resistenzbildungen gegen gängige Antimalariamedikamente sowie die oftmals starken Nebenwirkungen erhältlicher Chemotherapeutika veranlassen zu einer verstärkten Suche nach neuen Wirkstoffen zur Behandlung von Malaria. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit die inhibitorische Wirkung von im Rahmen des SFB630 neu synthetisierten peptidomimetischen Substanzen sowie von

Derivaten der Etacrynsäure auf asexuelle Blutstadien von *P. falciparum* getestet. Bei diesen Substanzen handelt es sich um potentielle Cysteinprotease-Inhibitoren, welche bereits an rekombinant exprimierten FP-2 bzw. FP-3 getestet wurden.

Für den Test der synthetisierten Inhibitoren auf ihre antiplasmodiale Aktivität wurde zunächst ein *in vitro* Screeningverfahren (Malstat-Viabilitätsassay) auf Basis der Hemmung von plasmodialer Laktatdehydrogenase etabliert. Die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung auf asexuelle Blutstadien wurde anschließend im Mikrodilutionsverfahren durch Ermittlung der halbmaximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) der verschiedenen Inhibitoren unter Verwendung des chloroquinsensitiven *P.-falciparum*-3D7-Stammes bestimmt. Um nähere Aufschlüsse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten, wurde die halbmaximale Hemmkonzentration danach mit den vorliegenden Daten zur inhibitorischen Wirkung an rekombinant exprimierten FP-2 und FP-3 verglichen.

Zur Validierung des Malstat-Viabilitätsassays mussten zunächst die Versuchsbedingungen eingestellt und die erhaltenen  $IC_{50}$ -Konzentration mit bekannten Literaturwerten verglichen werden. Hierfür wurde eine Chloroquin-Verdünnungsreihe mit einer Endkonzentration von  $10^{-1}$  mM- $10^{-8}$  mM hergestellt. Nachfolgend wurde eine synchronisierte asexuelle *P.-falciparum*-3D7-Blutkultur auf 1% Parasitämie eingestellt und für 72 Stunden mit den jeweiligen Chloroquin-Verdünnungsstufen in einer Vierfachbestimmung bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Malstat-Viabilitätsassay durchgeführt und die optische Dichte bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.8). Aus den Messergebnissen jeder Vierfachbestimmung wurde, unter Verwendung des GraphPad-Prism4-Programms, der Mittelwert sowie die Standardabweichung der  $IC_{50}$ -Konzentration bestimmt und mit dem Literaturwert verglichen.

Der Vergleich der anhand des Malstat-Viabilitätsassays erhaltenen  $IC_{50}$ -Konzentration von 3,8 nM (Standardabweichung:  $\pm 0,07$ ) für den Inhibitor Chloroquin mit der von Quashie *et al.* im Jahre 2006 veröffentlichten  $IC_{50}$ -Konzentration von 7,2 nM für Chloroquin unter Verwendung des [ $^3$ H]-Hypoxanthin-Assays zeigte eine gute Übereinstimmung der Resultate der beiden Messmethoden. Die Messergebnisse der zweimaligen Validierung des Malstat-Assays mit Chloroquin ist in Abb. 3.28 graphisch dargestellt.

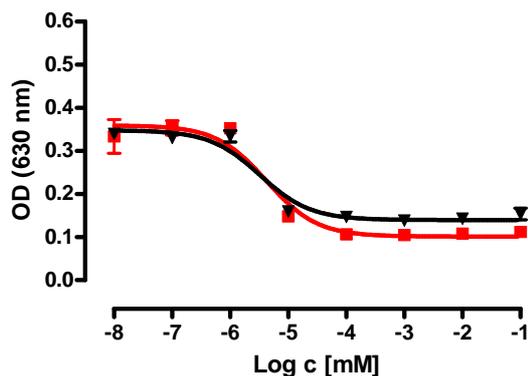


Abb. 3.28. Validierung der Testbedingungen des Malstat-Assays mit Hilfe des antiplasmodialen Inhibitors Chloroquin. Anhand einer Verdünnungsreihe mit Chloroquin wurde eine  $IC_{50}$ -Konzentration von 3,8 nM unter Verwendung des Malstat-Assays bestimmt, welcher gut mit dem Literaturwert (Quashie *et al.*, 2006; 7,2 nM) vergleichbar ist. OD, Optische Dichte bei einer Extinktion von 630 nm; Log c, Logarithmische Auftragung der eingesetzten Chloroquin-Konzentration in mM; Rote und schwarze Kurve, Messergebnisse der ersten Chloroquin-Testreihe (in Rot) und der zweiten Chloroquin-Testreihe (in Schwarz).

### 3.3.2 Einfluss der Peptidomimetika auf *P.-falciparum*-Blutstadien

Zur Bestimmung der antiplasmodialen Aktivität der Peptidomimetika im Malstat-Viabilitätstest wurde ein Messbereich zwischen  $10^{-1}$  mM und  $10^{-8}$  mM (logarithmisch äquidistant, log10) gewählt. Hierfür wurde eine Stammlösung des jeweiligen Inhibitors mit einer Konzentration von 20 mM in 100% DMSO hergestellt (siehe Kapitel 2.2.3.8). Aufgrund der schlechten Löslichkeit der erhaltenen Inhibitoren in AlbuMax<sup>TM</sup>II-Medium bzw. in  $H_2O_{bidest}$  mussten diese in DMSO gelöst werden. Anhand einer Konzentrationsreihe von 0-1% war zuvor diejenige Endkonzentration dieses Lösungsmittels (0,5% DMSO), welche das Wachstum der *P.-falciparum*-3D7-Blutkultur nicht inhibiert, bestimmt worden. Die Stammlösungen wurden anschließend im Mikrodilutionsverfahren logarithmisch äquidistant (log10) verdünnt und eine synchronisierte, asexuelle *P.-falciparum*-3D7-Blutkultur (1% Parasitämie) wurde für 72 Stunden mit den jeweiligen Verdünnungsstufen der verschiedenen Peptidomimetika inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Malstat-Viabilitätstest durchgeführt und die optische Dichte gemessen. Als Negativkontrolle wurde eine mit 0,5% DMSO-Medium behandelte *P.-falciparum*-3D7-Blutkultur mitgeführt. Als Positivkontrolle diente eine mit Chloroquin-Medium behandelte *P.-falciparum*-3D7-Blutkultur.

Die Auswertung des Malstat-Viabilitätsassays zeigte, dass der Inhibitor P-1b mit einer  $IC_{50}$ -Konzentration von 9,1  $\mu$ M die höchste antiplasmodiale Aktivität besaß, während für das Peptidomimetikum P-2e keine antiplasmodiale Wirkung (k. I., keine Inhibierung)

festgestellt werden konnte. Eine Zusammenfassung der IC<sub>50</sub>-Konzentration mit den zugehörigen Standardabweichungen aller getesteten Peptidomimetika ist in Tab. 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3. Vergleich der IC<sub>50</sub>-Konzentration der an *P.-falciparum*-3D7-Blutkulturen getesteten Peptidomimetika mit den zugehörigen Standardabweichungen (Stdw.)

Substanzbezeichnung	Molmasse [M]	IC <sub>50</sub> [µM]	Stdw. ±
P-1a	767,23	55,4	0,034
P-1b	781,26	9,1	0,000
P-1c	829,30	13,5	0,017
P-1d	859,33	59,6	0,000
P-2a	663,08	18,1	0,008
P-2b	677,10	56,5	0,020
P-2c	725,15	64,3	0,058
P-2d	755,18	<100	0,000
P-2e	643,02	k. I.	-

Die inhibitorische Aktivität dieser Peptidomimetika mit einer Vinylsulfonkopfgruppe war bereits an rekombinatem FP-2-Enzym getestet worden (Ettari *et al.*, 2008). Hierbei konnte eine starke Hemmung der enzymatischen Aktivität von FP-2 durch fast alle oben aufgeführten peptidomimetischen Inhibitoren festgestellt werden. Lediglich für die peptidomimetische Verbindung P-2e, welche ebenfalls keine antiplasmodiale Aktivität zeigte, konnte keine Hemmung von rekombinanten FP-2 festgestellt werden.

### 3.3.3 Einfluss der Etacrynsäurederivate auf *P.-falciparum*-Blutstadien

Der Messbereich der in den Viabilitätstest eingesetzten Etacrynsäurederivate lag zwischen von 10<sup>0</sup> mM-10<sup>-8</sup> mM. Dazu wurden von jedem Inhibitor Stammlösungen in einer Konzentration von 200 mM in 100% DMSO hergestellt und eine synchronisierte, asexuelle *P.-falciparum*-3D7-Blutkultur (1% Parasitämie) wurde, wie oben beschrieben, für 72 Stunden mit den jeweiligen Verdünnungsstufen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ebenfalls der Malstat-Viabilitätstest durchgeführt und die optische Dichte gemessen.

Mit den oben angeführten Verdünnungsstufen war jedoch eine exakte Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Konzentration nicht möglich. Daher wurden in einer weiteren Testreihe

Verdünnungen mit einem Meßbereich von  $10^0$  mM bis  $10^{-4}$  mM gewählt, wobei zwischen  $10^0$  mM und  $10^{-1}$  mM zusätzliche Verdünnungsstufen eingeführt wurden. Ausgehend von der Konzentrationsstufe A1 ( $10^1$  mM) wurden diese durch logarithmisch äquidistante 4:5 Verdünnungen (A2-A11;  $10^{0,9}$  mM- $10^0$  mM) hergestellt. Von der entsprechenden Dilution wurden dann jeweils 20  $\mu$ l zu 180  $\mu$ l Kultur gegeben. Als Negativkontrolle wurde, wie bereits zuvor beschrieben, eine mit 0,5% DMSO-Medium behandelte *P.-falciparum*-3D7-Blutkultur und eine mit Chloroquin-Medium behandelte *P.-falciparum*-3D7-Blutkultur als Positivkontrolle mitgeführt.

Mit diesen zusätzlichen Verdünnungsstufen konnte die  $IC_{50}$ -Konzentration bestimmt werden. Dabei wiesen das acylierte Anisol, E-6, mit einer  $IC_{50}$ -Konzentration von 16,9  $\mu$ M sowie das Etacrynsäureamid ohne aktivierte Doppelbindung, E-3, mit einer  $IC_{50}$ -Konzentration von 66,4  $\mu$ M die höchste antiplasmodiale Aktivität auf. Für den Inhibitor E-7 konnte hingegen keine antiplasmodiale Wirkung (k. I., keine Inhibierung) festgestellt werden. In Tabelle 3.4 sind die jeweiligen  $IC_{50}$ -Konzentration sowie die zugehörigen Standardabweichungen der getesteten Etacrynsäurederivate gegenübergestellt.

Tab. 3.4. Vergleich der  $IC_{50}$ -Konzentration ( $IC_{50}$  [ $\mu$ M]) der an *P.-falciparum*-3D7-Blutkulturen getesteten Etacrynsäurederivate mit den zugehörigen Standardabweichungen (Stdw.)

Substanzbezeichnung	Molmasse [M]	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Stdw. $\pm$
E-1	252,24	79,8	0,057
E-2	307,37	124,9	0,079
E-3	295,36	66,4	0,030
E-4	308,35	142,3	0,049
E-5	307,37	141,0	0,005
E-6	166,27	16,9	0,000
E-7	148,16	k. I.	-
E-8	201,22	118,4	0,004

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Etacrynsäurederivate waren Teil einer umfassenden Untersuchung der antiplasmodialen Wirkung von Etacrynsäurederivaten unter Verwendung des chloroquinsensitiven Stammes 3D7 bzw. des chloroquin-resistenten Stammes W2 von *P. falciparum* sowie des inhibitorischen Effekts auf rekombinant exprimiertes FP-2 und FP-3 (Dude *et. al.*, 2008).

## 4 Diskussion

### 4.1 Expression und Funktion von *PfCCp5* und *PfFNPA* im Lebenszyklus von *P. falciparum*

Die Sexualphase des Malariaerregers *P. falciparum* ist essentiell für die Verbreitung des Erregers. Sie beginnt mit der Differenzierung eines Teils der asexuellen Blutstadien im menschlichen Wirt zu Gametozyten. Im Mitteldarm der weiblichen *Anopheles*-Mücke entwickeln sich die Gametozyten dann zu den weiblichen Makrogameten sowie zu den männlichen, motilen Mikrogameten, die aus den Erythrozyten ausbrechen. Aus diesen Gameten geht nach der Befruchtung eine Zygote hervor, die sich in einen infektiösen, motilen Ookineten umformt. Dieser durchdringt das Mitteldarmepithel der Mücke und entwickelt sich zwischen dem Epithel und der Basallamina zur Oozyste. In der Oozyste reifen anschließend die für den menschlichen Zwischenwirt infektiösen Sporoziten heran. Die molekularen Mechanismen, welche die Entwicklung einer Subpopulation von Schwestermerozoiten zu Gametozyten, ihre Reifung und die Gametogenese regulieren, sind dabei immer noch weitgehend unerforscht (Übersichtsartikel Talman *et al.*, 2004; Alano and Billker, 2005). Bekannt ist bisher ausschließlich, dass diese Vorgänge von einer genau festgelegten Expressionsabfolge sexualstadienspezifischer Proteine begleitet werden (Übersichtsartikel Alano, 2007; Pradel, 2007; Dixon *et al.*, 2008). Hierzu gehören sowohl die Proteine *Pfs25* und *Pfs28* als auch die Proteine *Pfs230* und *Pfs48/45*, welche viel versprechende Kandidaten für die Entwicklung von Transmissionsblockierenden Vakzinen (TBV) sind (Pradel, 2007; Saul, 2007). Das mit den osmiophilen Körperchen assoziierte *Pfg377*- (Alano *et al.*, 1995; Severini *et al.*, 1999) und das zu *Pfs25* paraloge *Pfs28*-Protein der Ookineten (Duffy and Kaslow, 1997) sind ebenso mögliche TBV-Kandidaten. Weitere sexualstadienspezifisch exprimierte Proteine sind die in frühen Gametozytenstadien nachgewiesenen *Pfs16*- (Moelans *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1994; Bruce *et al.*, 1994), *Pfg27*- (Carter *et al.*, 1989; Alano *et al.*, 1991) sowie die *Pfpeg3*- und *Pfpeg4*-Proteine (Silvestrini *et al.*, 2005; Lanfrancotti *et al.*, 2007).

Auch die *PfCCp*-Proteine werden sexualstadienspezifisch im Lebenszyklus von *P. falciparum* exprimiert (Pradel *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2008). Aufgrund einer gemeinsamen LCCL-Domäne wurden sie *PfCCp1* bis *PfCCp5* benannt (Pradel *et al.*, 2004; Templeton *et al.*, 2004). Dem sechsten Mitglied, *PfFNPA*, fehlt diese namensgebende LCCL-Domäne. Unter Berücksichtigung seiner ausgeprägten Ähnlichkeit zu

*PfCCp5* und einer damit möglichen Verwandtschaft beider Proteine wurde es jedoch mit in die *PfCCp*-Familie integriert (Pradel *et al.*, 2004). Die Mitglieder der *PfCCp*-Familie wurden auch unter dem Namen *PfLAP* beschrieben und es wurden Orthologe in dem Nagermalariaerreger *P. berghei* gefunden (Delrieu *et al.*, 2002; Claudianos *et al.*, 2002; Trueman *et al.*, 2004). Die sechs kodierenden Gene der *PfCCp*-Proteine besitzen jeweils eine Signalpeptidsequenz, während ihnen Sequenzen für Transmembrandomänen oder einen GPI-Anker fehlen. Daher wird angenommen, dass die Proteine sekretiert werden. Des Weiteren lässt ihr komplexer Aufbau aus multiplen Adhäsionsdomänen auf eine Beteiligung an Protein-, Lipid- oder Polysaccharidbindungen schließen (Übersichtsartikel Pradel, 2007). Sie könnten auf Grund dessen an der Erkennung von Wirtsrezeptoren beteiligt sein, oder bei parasitären Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen.

Untersuchungen zur Expression der *PfCCp*-Familie zeigten, dass *PfCCp1*, *PfCCp2*, *PfCCp3* und *PfCCp4* in der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten lokalisieren und diese vier Proteine ausschließlich in der Sexualphase des Parasiten nachweisbar sind (Delrieu *et al.*, 2002; Pradel *et al.*, 2004, 2006; Scholz *et al.*, 2008). Dabei weisen *PfCCp1*, *PfCCp2* sowie *PfCCp3* ein punktiertes Expressionsmuster auf. *PfCCp4* zeigt abweichend dazu eine homogene Oberflächenverteilung in reifen Gametozyten. Während die Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* erst in Gametozyten des Stadium II nachweisbar ist, wird *PfCCp4* bereits in Gametozyten des Stadium I exprimiert. Anhand von Immunfluoreszenzstudien konnte außerdem eine partielle Freisetzung von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* während der Gametogenese sowie deren matrixähnliche Anordnung um entstehende Exflagellationszentren festgestellt werden (Pradel *et al.*, 2004). Das *PfCCp4*-Protein lokalisiert zwar ebenso wie *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten, es wird aber im Gegensatz zu den anderen drei Mitgliedern der *PfCCp*-Familie nicht bei der Gametogenese freigesetzt und weist auch in Makrogameten ein homogenes Expressionsmuster auf. Im Verlaufe der Gametogenese lässt die Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* rasch nach und ist in Zygoten nur noch sehr schwach detektierbar. Auch für *PfCCp4* ist in Zygoten ein Rückgang der Expression feststellbar, jedoch wird dieses Protein im Laufe der Ookinetenreifung erneut exprimiert. Es weist dabei in reifen Ookineten eine ähnliche oberflächenassoziierte Verteilung auf, wie sie bereits in Gametozyten gezeigt werden konnte. Studien unter Verwendung von *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Mutanten deckten die Beteiligung dieser beiden Proteine an der Migration reifer Sporozoiten aus den Mitteldarmoozysten in die Speicheldrüsen der Mücken auf (Pradel *et al.*, 2004). Im Unterschied dazu ließen *PfCCp4*-KO-Studien keinen Einfluss dieses Proteins auf die Oozystenentwicklung und die anschließende

Migration der Sporozoiten erkennen. *PfCCp4* scheint somit kein essentielles Protein für die Entwicklung von *P. falciparum* in der Mücke zu sein (Scholz *et al.*, 2008). Sowohl *PfCCp2* als auch *PfCCp3* erfüllen aufgrund der oben beschriebenen Befunde zwei wichtige Kriterien, die sie zu TBV-Kandidaten machen. Dies sind zum einen ihre sexualstadienspezifische Expression und zum anderen ihre essentielle Funktion während der Entwicklung von *P. falciparum* in der Mücke.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der bisher nur hypothetischen Proteine *PfCCp5* und *PfFNPA*. Hierzu wurden RT-PCR-Studien sowie, nach Herstellung polyklonaler Antiseren gegen rekombinante Proteine von *PfCCp5* bzw. *PfFNPA*, Immunfluoreszenzstudien und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Anhand von RT-PCR-Studien konnte ein hohes Expressionsniveau beider Proteine in NF54-WT-Gametozyten sowie in ausbrechenden Gameten gezeigt werden. In NF54-WT-Trophozoiten war hingegen keine Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* nachweisbar. Auch in Schizonten des NF54-WT-Stammes sowie des gametozytendefizienten F12-Stammes konnte keine Expression von *PfFNPA* detektiert werden. Dahingegen konnte für *PfCCp5* in Schizonten des NF54-WT-Stammes ein hohes Expressionsniveau festgestellt werden, während in Schizonten des F12-WT-Stammes kein *PfCCp5*-Transkript detektiert wurde. Western-Blot-Analysen bestätigten eine Expression von *PfCCp5* in NF54-WT-Schizonten. Anhand von Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung von polyklonalen Antiseren gegen rekombinantes *PfCCp5*-Protein konnte anschließend gezeigt werden, dass dieses Mitglied der *PfCCp*-Familie nur in einer Subpopulation von NF54-WT-Schizonten detektierbar ist (Scholz *et al.*, 2008). In reifenden Gametozyten war eine Expression sowohl von *PfCCp5* als auch von *PfFNPA* allerdings ebenso wie diejenige von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* erst im Stadium II detektierbar und diese hält bis zum Stadium V an (Scholz *et al.*, 2008). *PfCCp5* ist somit nicht nur das einzige Mitglied der *PfCCp*-Proteinfamilie, das bereits in einem Teil der asexuellen Blutstadien exprimiert wird, sondern es wird auch ausschließlich in Schizonten des NF54-WT-Stammes exprimiert, welcher zur Gametozytenbildung befähigt ist. Die erhaltenen RT-PCR-Expressionsdaten und die Analysen auf Proteinebene anhand von Western-Blot- und Immunfluoreszenzstudien legen daher die Vermutung nahe, dass *PfCCp5* eine mögliche essentielle Funktion im Verlauf der Gametozytogenese hat. Es bleibt jedoch unklar, warum *PfCCp5*, nach einer anfänglichen Expression in einer Subpopulation von Schizonten, anhand von Immunfluoreszenzuntersuchungen erst wieder in Gametozyten des Stadium II detektierbar ist. Ein geringes Proteinexpressionsniveau könnte, verbunden mit einer mangelnden Sensitivität der zur Verfügung stehenden Antiseren den fehlenden Expressionsnachweis ins Besondere von *PfCCp5* aber auch von *PfFNPA* in

Gametozyten des Stadium I erklären. RT-PCR- sowie Western-Blot-Analysen unter Verwendung von Gametozyten des Stadium I könnten hierbei eine vorhandene Expression beider Proteine in diesen frühen Sexualstadien aufdecken.

Wie nachfolgende Untersuchungen an Gametozyten mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie und elektronenmikroskopische Studien zeigten, lokalisieren beide Proteine, ähnlich wie *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*, plasmamembranassoziiert unterhalb der Membran der parasitophoren Vakuole. Zusätzlich konnte für beide Proteine eine intrazelluläre Expression in reifen Gametozyten festgestellt werden. Mit zunehmendem Reifegrad der Gametozyten konzentrieren sich außerdem *PfCCp5* und *PfFNPA*, im Gegensatz zu *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*, an den Zellpolen der Parasiten (Scholz *et al.*, 2008). Im Unterschied zu *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*, war jedoch in aktivierten Gametozyten keine Freisetzung und auch keine anschließende matrixartige Anordnung dieser beiden Proteine um entstehende Exflagellationszentren zu beobachten. Vielmehr bleiben *PfCCp5* und *PfFNPA* im Verlauf der Gametogenese mit der Oberfläche von Makrogameten assoziiert. RT-PCR-, Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzstudien bestätigten hingegen übereinstimmend einen Rückgang der Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Zygoten, wie sie bereits für *PfCCp1* bis *PfCCp4* beschrieben wurde (Pradel *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2008). Während der Ookinetenreifung ist dann das Signal beider Proteine mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen nicht mehr nachweisbar.

Anhand von Ko-Markierungsstudien konnte bereits gezeigt werden, dass *PfCCp1* und *PfCCp4* in Gametozyten beider Geschlechter exprimiert werden (Scholz *et al.*, 2008). Für diese Untersuchungen wurden Antiseren gegen *Pfs25*, einem Oberflächenprotein von Gametozyten, Makrogameten und Zygoten (Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990) und *Pfalpa-Tubulin-II*, einem Protein männlicher Gametozyten und Gameten (Rawlings *et al.*, 1992) sowie gegen *PfMR5*, einem Paralog von *Pfs230* in männlichen Gametozyten (Eksi und Williamson, 2002) verwendet. Hierbei war eine verstärkte Expression in Makrogametozyten und Makrogameten zu beobachten. Eine Expression von *PfCCp1* und *PfCCp4* in exflagellierenden Mikrogameten konnte dagegen nicht detektiert werden. Auch für *PfCCp5* sowie für *PfFNPA* war mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen keine ausgeprägte geschlechtsspezifische Expression in Gametozyten feststellbar. Ebenso konnte auch für diese beiden Proteine kein Signal in exflagellierenden Mikrogameten detektiert werden. Diese Daten lassen darauf schließen, dass sich eine geschlechtsspezifische Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA* sowie der übrigen Mitglieder der *PfCCp*-Familie erst im Verlauf der Gametogenese manifestiert.

Im Unterschied dazu postulierten Khan *et al.* im Jahre 2005 eine ausschließlich weibliche Expression der *PfCCp*-Orthologe *PbCCp1/LAP2* und *PbCCp3/LAP1* in *P. berghei*. Diese makrogametozytenspezifische Expression der *PbCCp*-/*LAP*-Proteine wurde anhand von Promotorstudien mittels des GFP-(*green fluorescent protein*)-Reporterproteins detektiert. Hierfür waren Kreuzungsstudien unter Verwendung von *PbCCp*/*LAP*-KO-Parasiten sowie *Pbs47*-KO- bzw. *Pbs48/45*-KO-Parasiten durchgeführt worden. Diese konnten entweder keine weiblichen oder keine männlichen Gameten bilden. Bei Membranfütterungen erhielten die Mücken dann entweder ein Gemisch der unterschiedlichen KO-Gametozytenkulturen oder die Mücken konnten bei einer Blutmahlzeit an Mäusen, welche mit den verschiedenen KO-Parasitenstämmen infiziert worden waren, die Parasiten aufnehmen. Wie die Versuche zeigten, konnten lediglich nach Kreuzungen von *PbCCp1/LAP2*-, *PbCCp2/LAP4*-, *PbCCp3/LAP1*- bzw. *PbCCp4/LAP6*-KO-Parasiten mit den *Pbs48/45*-KO-Mutanten, welche nur weibliche Gameten bilden können, Sporozoit in den Speicheldrüsen der Mücke nachgewiesen werden. Aus diesem Befund wurde geschlossen, dass für eine vollständige Entwicklung des Parasiten in der Mücke eine funktionelle Kopie der *PbCCp*/*LAP*-Gene durch weibliche Gameten vererbt werden muss (Raine *et al.*, 2007). Ebenso berichteten Raine *et al.* im Jahre 2007 sowie kürzlich erst Carter und Kollegen (2008) von einer weiblichen Vererbung der *PbCCp*/*LAP*-Gene.

Des Weiteren weisen die *PfCCp*- und *PbCCp*/*LAP*-Proteine der beiden *Plasmodium*-Spezies divergierende Expressionsmuster auf. Für das *PbCCp3*-/*LAP1*-Protein von *P. berghei* wurde ursprünglich neben einer Expression in Gametozyten auch eine Expression in anderen Parasitenstadien, beginnend mit den asexuellen Blutstadien bis hin zu den Sporozoit in den Speicheldrüsen, beschrieben (Claudianos *et al.*, 2002; Trueman *et al.*, 2004). Außerdem wurde mittels Proteomanalysen festgestellt, dass die *PfCCp1*- und *PfCCp2*-Orthologe *PbCCp1/LAP2* und *PbCCp2/LAP4* auch in Ookineten und Oozysten exprimiert werden und das *PfCCp4*-Ortholog, *PbCCp4/LAP6*, wurde darüber hinaus auch in Sporozoit nachgewiesen (Trueman *et al.*, 2004). Die Analyse aller *PbCCp*-Transkripte mittels quantitativer RT-PCR und mittels Expression des GFP-Reporterproteins unter Kontrolle der *PbCCp1/LAP2*- bis *PbCCp4/LAP6*-spezifischen Promotoren brachte ähnliche Ergebnisse (Lavazec *et al.*, 2009). Diese Untersuchungen zeigten, dass die entsprechenden Transkripte aller *PbCCp*/*LAP*-Gene nicht nur in Gametozyten, sondern auch fünf, zehn und 15 Tage nach Membranfütterung von *Anopheles*-Mücken in Oozysten nachweisbar sind. Jedoch war die Transkriptmenge in Oozysten wesentlich geringer als in Gametozyten. Die Detektion von Transkript in den Mückenstadien könnte mit einer geringen Restaktivität der *PbCCp*/*LAP*-Promotoren erklärbar sein. Diese muss jedoch nicht zur Translation der

biologisch relevanten Proteine führen bzw. kann in einer nur sehr geringen Proteinexpression resultieren, welche nicht detektierbar ist, und würde somit eine mangelnde Expression der *PbCCp/LAP*-GFP-Konstrukte in den Oozysten erklären. Eine Expression der *PbCCp/LAP*-Proteine und hierbei im Speziellen für *PbCCp5/LAP3* in asexuellen Blutstadien der Parasiten bzw. in Sporozoiten war dagegen nicht detektierbar, wie sie zuvor bereits von Trueman und Kollegen (2004) beschrieben wurde. Im Unterschied zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RT-PCR-Analysen wurden für die Expressionsstudien von Trueman *et al.* (2004) bzw. von Lavazec *et al.* (2009) gemischte asexuelle Blutstadien von *Plasmodium* verwendet. Es ist daher nicht auszuschließen, dass anhand einer detaillierteren, stadienspezifischen Expressionsanalyse *PbCCp5/LAP3* ebenfalls in Schizonten detektierbar ist.

Der fehlende Nachweis der *PfCCp*-Expression in den Mückenstadien von *P. falciparum* anhand von indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen könnte hingegen, bei einem entsprechenden geringen Proteinexpressionsniveau, auf einer mangelnden Sensitivität der zur Verfügung stehenden Antiseren beruhen. Andererseits könnte bei den durchgeführten Immundetektionen ein fehlender Expressionsnachweis theoretisch auch auf einen Verlust der entsprechenden Epitope infolge von Prozessierung bzw. durch Konformationsänderung der Proteine zurückführbar sein (Trueman *et al.*, 2004). Der Einsatz von Antiseren, welche gegen unterschiedliche Domänen der jeweiligen *PfCCp*-Proteine gerichtet sind, sowie RT-PCR-Analysen an den Mückenstadien von *P. falciparum* könnten genauere Ergebnisse liefern und somit zur Klärung dieser oben beschriebenen widersprüchlichen Resultate beitragen.

Trotz ihrer konservierten Architektur innerhalb der Gattung *Plasmodium* weisen die *PfCCp*- und die *PbCCp/LAP*-Proteine noch weitere Unterschiede auf. Die Untersuchungen an jeweils zwei verschiedenen *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Parasitenstämmen, welche in mehreren unabhängigen Experimenten wiederholt wurden, ergaben, dass die Mitteldarmoozysten der *PfCCp2*- und *PfCCp3*-defizienten Stämme bis zur Sporozoitenentwicklung einen normalen Phänotyp aufwiesen (Pradel *et al.*, 2004). Die Morphologie sowie die Anzahl der Oozysten und die Sporozoitenreifung waren zwölf Tage nach der Membranfütterung von *Anopheles*-Mücken vergleichbar mit dem WT. Ein vom WT abweichender *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Phänotyp manifestierte sich erst bei der Migration der Sporozoiten aus den Oozysten in die Speicheldrüsen der Mücke. Die Ausschaltung der *PfCCp2*- und *PfCCp3*-Gene hatte, wie bereits oben erwähnt, eine vollkommene Blockierung der Sporozoitenmigration zu Folge. In *P. berghei* war hingegen bereits im Oozystenstadium eine vom WT abweichende Entwicklung zu beobachten. Die *PbCCp1/LAP2*-, *PbCCp3-/LAP1*- und *PbCCp4/LAP6*-defizienten Parasitenstämmen bildeten zwar eine mit dem WT vergleichbare Anzahl an

Oozysten, diese waren jedoch bereits sieben Tage nach der Membranfütterung gegenüber den gleichaltrigen WT-Oozysten signifikant vergrößert. Darüber hinaus nahm diese Vergrößerung im Verlauf der Oozystenreifung noch zu (Claudianos *et al.*, 2002; Raine *et al.*, 2007). Bei lichtmikroskopischen Analysen von späten Oozysten der *PbCCp1/LAP2*, *PbCCp2/LAP4*-, *PbCCp3/LAP1*- und *PbCCp4/LAP6*-KO-Parasiten wurden nachfolgend zwei verschiedene Oozysten-Subpopulationen gefunden. Die eine Subpopulation wies Ähnlichkeiten mit unreifen WT-Oozysten auf, die andere wies im Vergleich zum WT Degenerationen durch Vakuolenbildung auf (Claudianos *et al.*, 2002; Trueman *et al.*, 2004; Raine *et al.*, 2007). Transmissionselektronenmikroskopische Studien lokalisierten dann diese Vakuolenbildung im ER der Parasiten sowie eine unvollständige Organisation des Kernmaterials in *PbCCp/LAP*-defizienten Oozysten (Raine *et al.*, 2007). In den Oozysten der KO-Parasiten waren nur wenige vergrößerte Nuklei sichtbar, während in den Oozysten der WT-Parasiten bereits Sporozoiten gebildet wurden (Raine *et al.*, 2007). Zu einem ähnlichen Befund kam die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. J. Templeton am WMC (New York) nach Untersuchung von *P. berghei* Doppel-KO-Parasitenstämmen (Lavazec *et al.*, 2009). Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken mit *PbCCp1/PbCCp3*- und *PbCCp1/PbCCp4*-Doppel-KO-Parasiten zeigten bis zum Oozystenstadium ebenfalls keine Veränderung des Phänotyps. Anschließend waren jedoch auch hier anhand von lichtmikroskopischen Untersuchungen Degenerationen infolge von Vakuolenbildung sowie eine vollständige Unterbrechung der Sporozoitenentwicklung in den Oozysten zu erkennen. Eine stärkere Beeinträchtigung der Parasitenentwicklung durch die Ausschaltung zweier *PbCCp/LAP*-Gene war hingegen nicht feststellbar. Die bisherige Annahme, dass die *PCCp*-Proteine eine redundante Funktion haben könnten und die Ausschaltung eines der Gene durch die übrigen Mitglieder des *PCCp*-Familie kompensiert werden kann, wird von diesen Daten nicht gestützt. Eine Hypothese der Funktion der *PCCp*-Proteine ist daher, dass sie bei Prozessen der Befruchtung und der Bildung der Zygote beteiligt sind. Der Mangel eines der *PCCp*-Proteine könnte somit zu einer aberrierenden Meiose und einer damit verbundenen anormalen Zellteilung führen, die in einem solchen späten Phänotyp resultiert. Eine weitere Hypothese, die einen sich erst in der Sporozoitenentwicklung sichtbaren Phänotyp erklären würde, beruht auf der kürzlich veröffentlichten Beobachtung, dass das mit einem GFP-Konstrukt fusionierte *PbCCp3*-Protein mit dem Kristallkörper des Ookineten assoziiert ist (Carter *et al.*, 2008). Wenn der Kristallkörper der Ookineten eine Funktion bei der Reifung der Sporozoiten in den Oozysten hat, dann wäre eine Expression der *PCCp*-Proteine in den Sexualstadien des Erregers, die aber anschließende Manifestierung des Phänotyps der *PCCp*-defizienten Parasiten in den Oozysten erklärbar.

Aufgrund ihrer essentiellen Rolle in der Sexualphase der Erreger, besitzen sowohl *PfCCp2* als auch *PfCCp3* ein großes Potential als Kandidaten für die Entwicklung von TBV. Vermutlich übernehmen außerdem einige Mitglieder der *PfCCp*-Familie eine wichtige Funktion während der Gametogenese. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass gegen *PfCCp1*, *PfCCp2*, *PfCCp3*, *PfCCp4* und *PfFNPA* gerichtete Antikörper in Anwesenheit des Komplementsystems *in vitro* die Exflagellationsrate von männlichen Gameten teilweise vermindern (Scholz *et al.*, 2008).

Wie bereits zuvor erwähnt scheint jedoch *PfCCp4* keine essentielle Rolle bei der Entwicklung von *P. falciparum* in der Mücke zu spielen. Insgesamt fünf unabhängige Membranfütterungen zeigten sowohl eine normale Oozysten- als auch eine unauffällige Sporozoitenbildung innerhalb der Oozysten. Die gebildeten Sporozoiten waren auch mehrheitlich in der Lage in die Speicheldrüsen einzuwandern (Scholz *et al.*, 2008). Neuere Untersuchungen deuten außerdem darauf hin, dass *PfCCp4* nach einem Expressionstief im Zygotenstadium, nicht nur erneut in den Ookineten sondern möglicherweise anschließend auch in Speicheldrüsen-Sporozoiten exprimiert wird (Diplomarbeit von F. Kohlhepp, 2009). Diese Daten bedürfen allerdings noch einer genaueren Prüfung. Für das sexualstadienspezifische *Pfs47*-Protein wurde bereits eine ähnlich redundante Funktion beschrieben. *Pfs47* wird auf der Oberfläche weiblicher Gametozyten und Gameten exprimiert und ist zu *Pfs48/45* paralog. Doch während *Pfs48/45* für die Befruchtung von Makrogameten unerlässlich ist (van Dijk *et al.*, 2001), ist die Transmission der Parasiten durch Ausschaltung von *Pfs47* nicht beeinträchtigt (van Schaijk *et al.*, 2006). Theoretisch wäre ein vom WT nicht abweichender KO-Phänotyp durch eine Rückmutation und dem damit einhergehenden Verlust der KO-Vektorintegration erklärbar. Hierbei handelt es sich jedoch um ein sehr seltenes Ereignis (Tsai *et al.*, 2001). Bei allen fünf unabhängig voneinander klonierten *PfCCp4*-KO-Parasitenstämmen war jedoch ein ähnlicher Phänotyp zu beobachten und eine Rückmutation ist daher nahezu auszuschließen (Scholz *et al.*, 2008).

Zur funktionalen Charakterisierung von *PfCCp5* und *PfFNPA* wurde versucht, die entsprechenden Gene mit Hilfe von homologer *single-crossover*-Rekombination auszuschalten. Hierfür wurden zunächst Fragmente der Gene in das pDT-*Tg23*-Ko-Plasmid, kloniert und anschließend in asexuelle NF54-WT-Blutstadien transfiziert (Wu *et al.*, 1996). Diese Vektoren besitzen eine Resistenzkassette, anhand derer die Parasiten, welche das Plasmid aufgenommen haben, positiv selektiert werden können. Die Transfektion der in das pDT-*Tg23*-Plasmid klonierten *PfCCp5*- und *PfFNPA*-DNA-Fragmente wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt. Im Nachfolgenden Integrationsnachweis anhand von diagnostischer PCR konnte jedoch nur das Vorliegen des episomalen Vektors gezeigt werden und keine Aufnahme des entsprechenden

Plasmids in den WT-Locus beider Gene detektiert werden. Daher wurden in einem Parallelansatz, um zu überprüfen, ob die *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Loci für genetische Manipulationen zugänglich sind bzw. ob die beiden Proteine eine essentielle Funktion besitzen, sowohl DNA-Fragmente beider Gene in das pCAM-BSD-KO-Plasmid als auch in einen Komplementationsvektor namens pCAM-BSD-Comp-Vektor kloniert und in asexuelle NF54-WT-Blutstadien transfiziert (Mamoun *et al.*, 1999; Dorin-Semlat *et al.*, 2007). Nach erfolgter positiver Selektion konnte in den mit den *PfCCp5*-BSD-KO- und mit dem *PfFNPA*-BSD-KO1-Konstrukt transfizierten WT-Blutkulturen nach 90 Tagen kein erneutes Wachstum der Parasiten beobachtet werden. Die mit dem *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Comp-Konstrukten transfizierten WT-Blutkulturen unter Verwendung des pCAM-BSD-Comp-Vektors zeigten hingegen bereits nach 45 Tagen ein erneut reges Parasitenwachstum. Mittels diagnostischer PCR war es möglich eine stabile Integration dieser Konstrukte und somit die Zugänglichkeit des *PfCCp5*- bzw. des *PfFNPA*-Locus für genetische Manipulationen nachzuweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl *PfCCp5* als auch *PfFNPA* eine essentielle Funktion im Lebenszyklus von *P. falciparum* haben und dass die vollständige Ausschaltung dieser beiden Gene, im Gegensatz zur Ausschaltung von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3*, letal für den Parasiten ist. Außerdem scheint sich der Phänotyp der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-defizienten Parasiten bereits in den Blutstadien bzw. in den Gametozytenstadien, welche als Folge des physiologisch erzeugten Stresses durch Selektion mit Blastizidin gebildet werden, zu manifestieren. Unter Einbeziehung der mittels RT-PCR-, Western-Blot und Immunfluoreszenz-Analysen gewonnenen Daten zur Expression von *PfCCp5* in einem Teil der Schizonten des gametozytenbildenden NF54-WT-Stammes sowie die Abwesenheit des Proteins im gametozytendefizienten F12-WT-Stamm ist eine Rolle dieses Proteins bei der Regulation des Zellzyklus denkbar. Ähnliches postulierten bereits Raine und Kollegen für die *PbCCp*/LAP-Proteine, denen sie eine regulatorische Funktion im Zellzyklus, insbesondere bei der Zytokinese der Sporozoiten, zusprachen (Raine *et al.*, 2007). Eine weitere mögliche Funktion von *PfCCp5* könnte die Beteiligung an der stadienspezifischen Modifikation der parasitophoren Vakuole und des infizierten Erythrozyten sein, wie sie bereits Eksi und Kollegen (2005) für das ebenfalls in einer Subpopulation von Schizonten und frühen Gametozyten exprimierte *Pfg14.748* vermuteten.

Zum Zwecke einer detaillierteren Funktionsanalyse der Domänen des *PfFNPA*-Proteins, wurde zusätzlich ein weiteres Fragment aus dem mittleren Abschnitt der translatierten 5'-Region des *PfFNPA*-Gens in den pCAM-BSD-KO-Vektor kloniert und anschließend in NF54-WT-Parasiten transfiziert. Dieses *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukt integriert im Falle einer homologen Rekombination domänenüberspannend in der

3'-Region der FN2- und der 5'-Region der Anth-Domäne von *PfFNPA*, sodass die 5'-Region der FN2-Domäne des Proteins noch exprimiert wird. Damit sollte zunächst überprüft werden, ob eine verkürzte Form des *PfFNPA*-Proteins ebenfalls zu einem Absterben der transfizierten Parasiten führt. Nach erfolgter Selektion konnte jedoch in den mit dem *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukt transfizierten WT-Blutkulturen schon innerhalb von 45 Tagen ein erneutes Parasitenwachstum beobachtet werden. Anhand einer diagnostischen PCR war es möglich, eine stabile Integration des *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukts nachzuweisen. Nachfolgende Southern-Blot-Analysen der vereinzelt Parasitenklone bestätigten die Integration des Konstrukts in den *PfFNPA*-WT-Locus (Simon *et al.*, 2009). Somit ist die Spaltung des Locus im Bereich der 3'-Region der FN2-Domäne offensichtlich nicht letal für den Parasiten und insbesondere die Anth-Domäne scheint keine essentielle Funktion für das Überleben von *P. falciparum* zu haben. Anschließende Immunfluoreszenz- sowie Western-Blot-Analysen unter Verwendung der polyklonalen Mausseren Anti-*PfFNPA*rp1 und Anti-*PfFNPA*rp2 deckten allerdings ein vollständiges Fehlen der *PfFNPA*-Proteinexpression in den Gametozyten, welche das *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukt in den WT-Locus des Gens integriert hatten, auf (A. Kühn, unveröffentlichte Daten; Simon *et al.*, 2009). Diese Daten sind insofern höchst interessant, als die partielle Ausschaltung des Proteins augenscheinlich zu einer vollständigen Unterbrechung der *PfFNPA*-Proteinexpression führt. Die *PfFNPA*-BSD-KO2-Mutanten weisen zwar lichtmikroskopisch keine morphologischen Unterschiede zu den WT-Parasiten auf, die Unterbrechung der Translation im 3'-Bereich der kodierenden Region von *PfFNPA* führt jedoch möglicherweise zu einer Degradierung oder einer Konformationsänderung der noch translatierten 5'-Region der FN2-Domäne, sodass keine korrekte Proteinexpression mehr nachweisbar ist. Denkbar wäre aber auch eine Freisetzung des unvollständig exprimierten *PfFNPA*-Proteinfragments in das umgebende Medium. Damit ist eine essentielle Funktion der Anth-Domäne bei der Stabilisierung des *PfFNPA*-Proteins denkbar. Von der FN2-Domäne wird hingegen vermutet, dass sie an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein könnte und daher eine mögliche wichtige Rolle bei der mutmaßlichen Interaktion mit den anderen Mitgliedern der *PfCCp*-Proteinfamilie innerhalb der parasitophoren Vakuole des Parasiten übernimmt (Pradel *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2009). Dieser Aspekt soll im Laufe der Diskussion noch einmal aufgegriffen werden. Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass sowohl *PfCCp5* als auch *PfFNPA* eine essentielle Funktion bereits im Verlauf der Gametozytogenese von *P. falciparum* haben könnten.

## 4.2 Molekulare Wechselwirkungen der PfCCp-Proteine während der Sexualphase von *P. falciparum*

Durch die vollständige Sequenzierung des *P.-falciparum*-Genoms wurde eine Reihe sexualstadienspezifischer Adhäsionsdomänen-Proteine aufgedeckt (Gardner *et al.*, 2002). Zu ihnen zählen die PfCCp-/LAP-Multiadhäsionsdomänenproteine (Dessens *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2004), aber auch die in den frühen Stadien der Gametozyten exprimierten Pfg14.744- und Pfg14.748-Proteine (Eksi *et al.*, 2005) sowie PfMR5 (Eksi and Williamson, 2002) und Pfs47 (van Schaijk *et al.*, 2006), welche beide ein cysteinereiches Motiv besitzen. Die Mehrheit der bekannten sexualstadienspezifischen Proteine wird dabei innerhalb der parasitophoren Vakuole im Verlauf der Gametozytenreifung exprimiert. Einige dieser Proteine werden anschließend während der Gametogenese an der Oberfläche von Gameten oder befruchteten Zygoten exponiert. Beispiele für oberflächenassoziierte Proteine sind die TBV-Kandidaten Pfs25, Pfs28, Pfs48/45 und Pfs47 bzw. Pfs230 und PfMR5, Pfpeg3, Pfpeg4, Pfg14.744 sowie Pfg14.748, aber auch die PfCCp-Familie (Übersichtsartikel Pradel, 2007). Trotz fortlaufender Charakterisierung der meisten dieser identifizierten sexualstadienspezifischen Proteine ist der Grund ihrer Expression innerhalb der parasitophoren Vakuole von Gametozyten, ihre Exposition im Verlauf der Gametogenese und die Funktion ihrer zahlreichen Adhäsionsdomänen bisher unbekannt.

Um die mögliche Funktion der PfCCp-Familie genauer beurteilen zu können, wurden in unserer Arbeitsgruppe erste ko-abhängige Expressions- sowie Ko-Lokalisationsstudien unter Verwendung reifer Gametozyten durchgeführt. Diese zeigten, dass PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 sowohl ko-abhängig exprimiert werden als auch innerhalb der parasitophoren Vakuole der Gametozyten ko-lokalisieren (Pradel *et al.*, 2006). Hierbei wurde festgestellt, dass in PfCCp3-defizienten Gametozyten PfCCp1 und PfCCp2 nicht exprimiert werden, obwohl das Transkriptlevel beider Proteine unverändert war (Pradel *et al.*, 2006). Darüber hinaus werden, wie bereits oben erwähnt, PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 während der Gametogenese partiell freigesetzt und umgeben entstehende Exflagellationszentren in einer matrixähnlich Anordnung (Pradel *et al.*, 2004). Zusammenfassend lassen diese Daten auf eine Komplexbildung von PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 verbunden mit der Interaktion der drei Proteine schließen (Pradel *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2006). Es wurde weiterhin vermutet, dass der Mangel von PfCCp3 hierbei zur Destabilisierung bzw. Degradierung und somit zum Verlust von PfCCp1 und PfCCp2 in den PfCCp3-KO- Parasiten führen könnte. Weitere unterstützende Hinweise auf eine Komplexbildung konnten anhand von Affinitätschromatographiestudien durch den Nachweis direkter Interaktionen rekombinant exprimierter PfCCp-Domänen erbracht werden (Wagner *et al.*, 2006). Für das in Gametozyten exprimierte Pfs230-

Protein ist bereits eine Interaktion mit *Pfs48/45* beschrieben worden. Diese beiden Proteine ko-lokalisieren innerhalb der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten. Das *Pfs230*-Protein wird sekretiert, wobei es an den GPI-Anker von *Pfs48/45* bindet und so mit ihm einen Komplex auf der Oberfläche von Gametozyten und Gameten bildet (Kumar, 1987; Kumar und Wizel, 1992). Weitere ko-abhängige Expressionsstudien anhand von Western-Blot-Analysen deckten im dem erst kürzlich generierten *PfCCp1*-KO-Parasitenstamm, 5YE2, ein Fehlen von *PfCCp2* und *PfCCp3* auf (Simon *et al.*, 2009). Eine ko-abhängige Expression von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* in *PfCCp4*-defizienten Gametozyten konnte hingegen nicht festgestellt werden. Mittels Immunfluoreszenzstudien an Gametozyten der *PfCCp1*-, *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Parasitenstämme konnte darüber hinaus eine von diesen drei *PfCCp*-Familienmitgliedern unabhängige Expression des *PfCCp4*-Proteins gezeigt werden. Es konnte außerdem keine Beeinträchtigung der Expression von *Pfs230* in *PfCCp4*-defizienten Gametozyten beobachtet werden. Anhand von Ko-Immunpräzipitationsstudien unter Verwendung von WT-Gametozytenlysate konnte jedoch eine direkte Interaktion von *PfCCp4* sowohl mit *Pfs230* als auch mit *Pfs48/45* nachgewiesen werden (Scholz *et al.*, 2008). Ebenso wurde in Immunfluoreszenzuntersuchungen eine Ko-Lokalisation von *PfCCp4* und *Pfs230* innerhalb der parasitophoren Vakuole detektiert.

In Studien an *Pfs230*- und *Pfs48/45*-defizienten Parasitenstämmen konnte zuvor eine deutliche Reduktion der Fertilisationsrate sowie der Zygoten- bzw. Oozystenbildung (van Dijk *et al.*, 2001; Eksi *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. So verlieren Mikrogameten *Pfs48/45*-defizienter Parasitenstämme ihre Fähigkeit zur Befruchtung (van Dijk *et al.*, 2001) und *Pfs230*-KO-Mikrogameten können nicht mehr an Erythrozyten adhären, wodurch es zu einer deutlich verminderten Ausbildung von Exflagellationszentren kommt (Eksi *et al.*, 2006). Bisher war es jedoch nicht möglich, Interaktionspartner von *Pfs230* auf der Oberfläche von Erythrozyten zu identifizieren. Ko-Immunpräzipitation von *Pfs230* und Glycophorin A, einem an der Ausbildung von Exflagellationszentren beteiligten Oberflächenprotein von Erythrozyten, konnten keine Interaktion dieser beiden Proteine detektieren (Templeton *et al.*, 1998; Eksi *et al.*, 2006). In Studien an *Pfs230*-defizienten Parasiten konnten ebenfalls keine Beeinträchtigung der *Pfs48/45*-Expression festgestellt werden (Eksi *et al.*, 2006). In *Pfs48/45*-defizienten Parasiten wird *Pfs230* zwar exprimiert, jedoch ist das Protein nicht mehr mit der Oberfläche der Gameten assoziiert und die Expressionsstärke ist deutlich reduziert (Eksi *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse sind in sofern schlüssig, als das GPI-verankerte *Pfs48/45*-Protein *Pfs230* mit der Plasmamembran assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von Western-Blot-Analysen unter Verwendung von Gametozytenlysate *PfCCp1*-, *PfCCp2*- und *PfCCp3*-defizienter

Parasitenstämme eine signifikanter Rückgang der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Expression und somit eine von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* ko-abhängige Expression beider Proteine festgestellt werden (Simon *et al.*, 2009). Nachfolgende Immunfluoreszenzstudien deckten in *PfCCp1*-KO-Gametozyten ein vollständiges Fehlen der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteinexpression auf, während das in Gametozyten noch zunächst intrazellulär lokalisierte *Pfs25* eine von *PfCCp1* unabhängige Expression zeigte. Auch die Immunfluoreszenzstudien an *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Gametozyten zeigten ein nahezu vollständiges Fehlen der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteinexpression. Mittels Western-Blot-Analysen sowie Immunfluoreszenzstudien an *PfCCp4*-KO-Gametozyten konnte dagegen nur eine verringerte Proteinexpression von *PfCCp5* und *PfFNPA* festgestellt werden. Eine mangelnde *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteinexpression wäre ebenfalls mit einer Destabilisierung bzw. Degradierung beider Proteine in den *PfCCp1*-, *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Parasiten erklärbar wie sie zuvor bereits zuvor für *PfCCp1* und *PfCCp2* in *PfCCp3*-defizienten Parasiten vermutet wurde (Pradel *et al.*, 2006). Die lediglich reduzierte Proteinexpression von *PfCCp5* und *PfFNPA* in *PfCCp4*-KO-Parasiten bestätigt hingegen die besondere Rolle von *PfCCp4* innerhalb der *PfCCp*-Familie. Kürzlich ist es ebenfalls gelungen, eine verminderte Expression aller übrigen *PfCCp*-Proteine in Gametozyten des in der vorliegenden Arbeit generierten *PfFNPA*-KO-Stammes nachzuweisen (Simon *et al.*, 2009). Insgesamt unterstützen diese Daten die Vermutung einer ko-abhängigen Expression der *PfCCp*-Mitglieder untereinander. Neuere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigen außerdem eine von *Pfs230* sowie von *Pfs48/45* unabhängige Expression aller *PfCCp*-Proteine (I. Rupp, unveröffentlichte Daten). Eine von *Pfs48/45* mögliche ko-abhängige Expression anderer sexualstadienspezifischer Proteine wurde bisher noch nicht untersucht. Es konnte hingegen bereits gezeigt werden, dass in *Pfs230*-KO-Gametozyten die sexualstadienspezifischen Oberflächenproteine *Pfs25*, *Pfs48/45*, *Pfpeg3*, *Pfpeg4* und das mit den osmiophilen Körperchen assoziierte *Pfg377* eine normale Expression aufweisen (I. Rupp, unveröffentlichte Daten). Des Weiteren konnte ebenso eine von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* unabhängige Expression der *Pfs25*-, *Pfs48/45*-, *Pfpeg3*- bzw. *Pfpeg4*- und *Pfg377*-Proteine unter Verwendung von *PfCCp1*-, *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Gametozyten festgestellt werden (Diplomarbeit von A. Kühn, 2007). Erste Daten deuteten zunächst ebenfalls auf eine von *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* unabhängige Expression des *Pfs230*-Proteins hin (Diplomarbeit von A. Kühn, 2007). Neuere Untersuchungen deckten jedoch eine verminderte Expression von *Pfs230* in *PfCCp3*-KO-Gametozyten und somit eine von *PfCCp3* mögliche ko-abhängige Expression auf (Diplomarbeit von F. Kohlhepp, 2009).

Da *PfCCp4* in *Pfs230*-KO-Gametozyten exprimiert wird, wäre eine Vermittlung der membranassoziierten Lokalisation von *PfCCp4* durch *Pfs48/45* denkbar. Hinweise hierfür lieferten durchgeführte Ko-Immunpräzipitationen, in denen neben einer Interaktion von *PfCCp4* mit *Pfs230* auch eine Interaktion von *PfCCp4* mit *Pfs48/45* detektiert wurde (Scholz *et al.*, 2008; S. Scholz, unveröffentlichte Daten). Dieser Hypothese widerspricht jedoch die zuvor beschriebene von *Pfs48/45* unabhängige Expression des *PfCCp4*-Proteins. Es ist aber denkbar, dass die Interaktion dieser drei Proteine über ein Brückenprotein vermittelt wird, welches genau wie *PfCCp4* unabhängig von *Pfs230* und *Pfs48/45* exprimiert wird. Ko-Immunpräzipitationen von *PfCCp4* mit weiteren sexualstadienspezifischen Proteinen wie *Pfs16* (Moelans *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1994; Bruce *et al.*, 1994), *Pfs25* (Vermeulen *et al.*, 1985, 1986) und *Pfpeg3* bzw. *Pfpeg4* (Silvestrini *et al.*, 2005; Alano, 2007; Lanfracotti *et al.*, 2007) könnten hierüber nähere Aufschlüsse geben. In Tab. 4.1 sind noch einmal alle bisher durchgeführten ko-abhängigen Expressionsstudien und die dazugehörigen Ergebnisse zusammengefasst. Eine im Vergleich zu den WT-Gametozyten unveränderte Expression ist hierbei mit zwei Pluszeichen (++) gekennzeichnet. Eine schwächere Expression im Vergleich zum WT ist mit einem Pluszeichen (+) angegeben. Eine vollständig fehlende Proteinexpression ist mit einem Minuszeichen (-) und eine sehr schwache bzw. stark abweichende Expression ist mit einem Plus-Minuszeichen (±) markiert. Bisher noch nicht durchgeführte Ko-Expressionsstudien sind mit einer Null (0) gekennzeichnet.

Tab. 4.1. Übersicht der Expression ausgewählter sexualstadienspezifischer Adhäsionsproteine in sieben verschiedenen KO-Parasitenstämmen

	<i>PfCCp1</i> - KO	<i>PfCCp2</i> - KO	<i>PfCCp3</i> - KO	<i>PfCCp4</i> - KO	<i>PfFNPA</i> - KO	<i>Pfs230</i> - KO	<i>Pfs48/45</i> - KO
<i>PfCCp1</i>	-	-	-	+	+	++	++
<i>PfCCp2</i>	-	-	-	+	+	++	++
<i>PfCCp3</i>	-	-	-	+	+	++	++
<i>PfCCp4</i>	+	+	+	-	+	++	++
<i>PfCCp5</i>	-	±	±	+	+	++	++
<i>PfFNPA</i>	-	±	±	+	-	++	++
<i>Pfs230</i>	++	++	+	++	++	-	-
<i>Pfs48/45</i>	++	++	++	++	++	++	-
<i>Pfs25</i>	++	++	++	++	++	++	++
<i>Pfg377</i>	++	++	++	++	0	++	0
<i>Pfpeg3</i>	++	++	++	++	0	++	0
<i>Pfpeg4</i>	++	++	++	++	0	++	0

In der vorliegenden Arbeit wurden Ko-Immunpräzipitationen unter Verwendung von WT-Gametozytenlysat durchgeführt. Hierbei konnten Interaktionen nativer *PfCCp*5- und *PfFNPA*-Proteine mit allen anderen Mitgliedern der *PfCCp*-Familie, mit Ausnahme von *PfCCp*4 festgestellt werden (Simon *et al.*, 2009). Die mangelnde Interaktion von *PfCCp*5 und *PfFNPA* mit *PfCCp*4 war jedoch auf eine geringe Effizienz des *PfCCp*4-Antiserums im Western Blot zurückzuführen. Durch Präzipitation mit *PfCCp*4-Antiserum konnte auch eine Interaktion von *PfCCp*4 mit *PfCCp*5 und *PfFNPA* bestätigt werden. Weiterhin konnten in unserer Arbeitsgruppe angefertigte Ko-Immunpräzipitationen Interaktionen aller anderen *PfCCp*-Proteine untereinander nachweisen (Simon *et al.*, 2009). Kürzlich ist es außerdem gelungen, Interaktionen von nativem *Pfs*25-Protein mit *PfCCp*1 und *PfCCp*2 WT-Gametozyten aufzudecken (Diplmarbeit von A. Kühn, 2007). Dabei kam es zu einer verstärkten Präzipitation von *PfCCp*1 und *PfCCp*2 in aktivierten WT-Gametozyten. *Pfs*25 und das zu ihm paraloge *Pfs*28 besitzen je vier EGF- (*epidermal growth factor*)-ähnliche Domänen und beide Proteine sind mittels eines Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankers mit der Plasmamembran verknüpft (Kaslow *et al.*, 1988). Das in *P. berghei* exprimierte *Pbs*25 wird jedoch erst nach der Gametozytenaktivierung an die Zelloberfläche transportiert (Billker *et al.*, 1997). Grund hierfür ist eine transkriptionelle Regulation der Expression von *Pbs*25. Die mRNA von *Pbs*25 liegt zwar bereits in unaktivierten Gametozyten vor, die Proteinsynthese beginnt jedoch erst nach Aktivierung der Gametozyten, da die Translation zuvor durch die RNA-Helikase DOZI (*development of zygote inhibited*) unterdrückt wird (Paton *et al.*, 1993; Mair *et al.*, 2006). Einen Überblick alle bisher nachgewiesenen Protein-Protein-Interaktionen von sexualstadienspezifisch exprimierten Proteinen gibt Abb. 4.1.

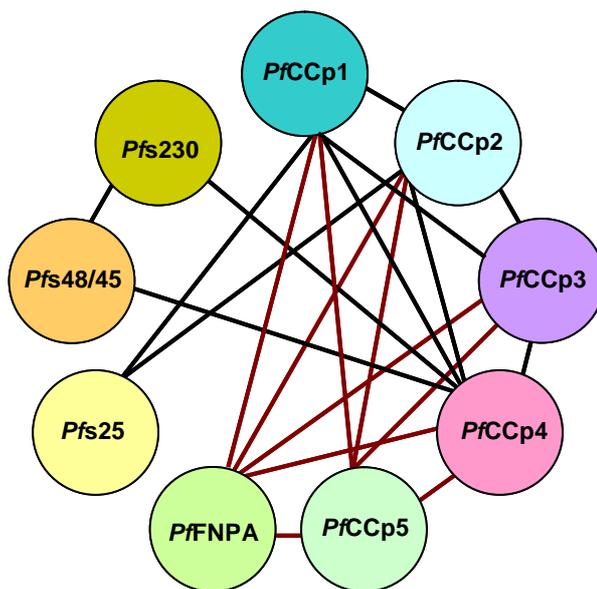


Abb. 4.1. Übersicht aller bisher nachgewiesenen Protein-Protein-Interaktionen von nativen, sexualstadienspezifisch exprimierten Proteinen. Es konnten Interaktionen der *PfCCp*-Familie untereinander und mit *Pfs*25, *Pfs*48/45 bzw. *Pfs*230 festgestellt werden (dunkelrot: diese Arbeit, schwarz: Kumar, 1987; Kumar und Wizel, 1992; Wagner *et al.* 2006; Scholz *et al.* 2008; Simon *et al.*, 2009; Diplomarbeit von A. Kühn, 2007).

Zur Klärung möglicher direkter Wechselwirkungen einzelner *PfCCp*-Domänen wurden ausgewählte rekombinante, domänenüberspannende *PfCCp*-Proteine mittels Affinitätschromatographiestudien analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnten hierbei direkte Interaktionen zwischen rekombinant exprimiertem *PfCCp*1rp1 und *PfCCp*5rp2, *PfFNPA*rp1 sowie *PfFNPA*rp2 aufgedeckt werden (Simon *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte der Nachweis einer direkten Interaktion von *PfCCp*3rp3 mit *PfCCp*5rp1 erbracht werden. Unter Einbeziehung aller 33 in unserer Arbeitsgruppe angefertigten Affinitätschromatographiestudien mit den verschiedenen rekombinanten *PfCCp*-Proteinen wurden 18 direkte Interaktionen rekombinanter *PfCCp*-Proteine identifiziert (Simon *et al.*, 2009; Abb. 4.2).

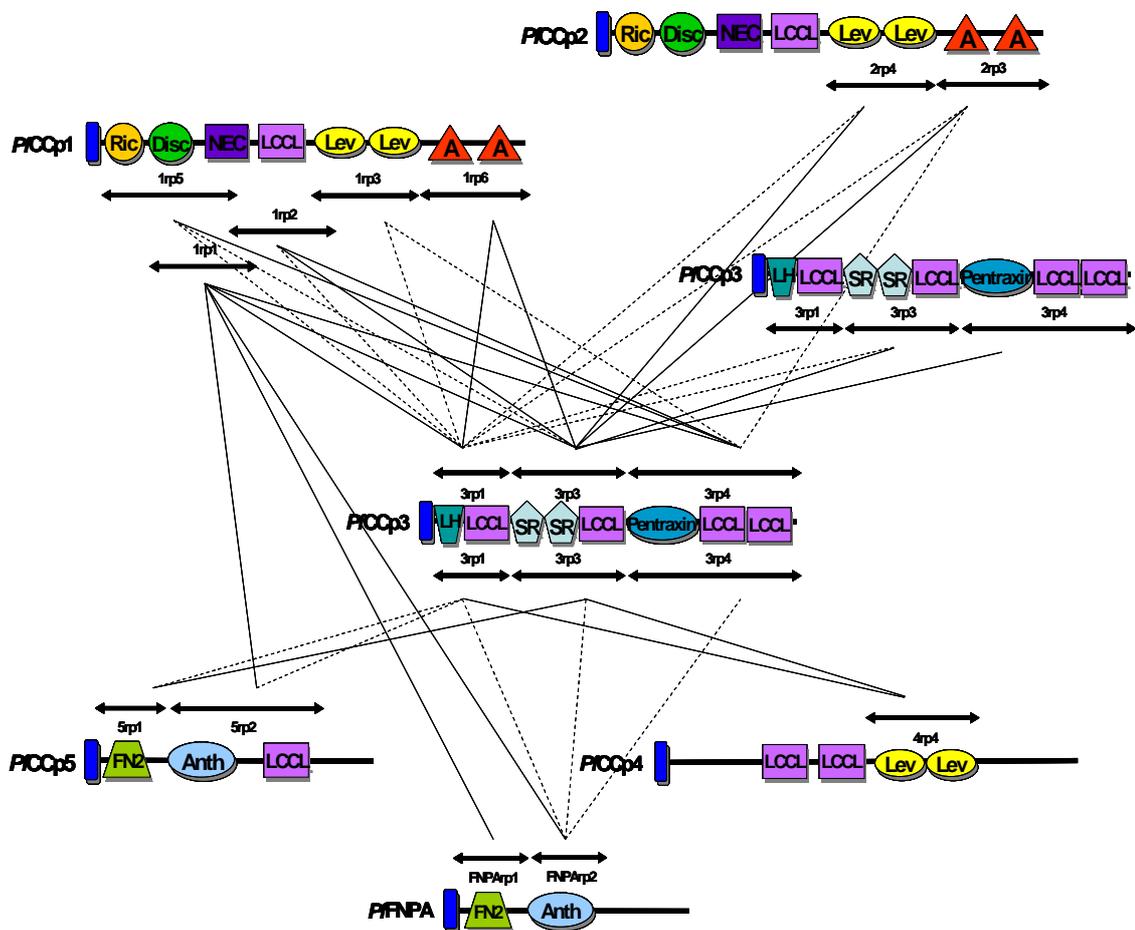


Abb. 4.2. Schematische Darstellung aller durchgeführten Affinitätschromatographiestudien sowie der nachgewiesenen Interaktionen zwischen rekombinanten *PfCCp*-Domänen. Nachgewiesene Interaktionen: durchgezogene Linien. Keine Interaktionen: gestrichelte Linien. Quelle: Simon *et al.*, 2009, verändert.

Regelmäßig wiederkehrende wechselseitige Interaktionen einzelner Domänen waren hierbei nicht feststellbar. Auffällig war jedoch, dass rekombinante Proteine, welche eine LCCL-Domäne, eine SR-Domäne oder eine NEC-Domäne beinhalten, überdurchschnittlich oft an direkten Interaktionen beteiligt waren. Bei insgesamt sechzehn

detektierten Interaktionen zwischen rekombinanten Proteinen war die LCCL-Domäne anwesend (48,5%) und in neun Fällen war die SR- bzw. die NEC-Domäne (27%) beteiligt. Bei sieben Interaktionen enthielten die rekombinanten Proteine eine Ricin-Domäne (21%) und sechsmal war die Discoidin-Domäne (18%) an Interaktionen beteiligt. Die Pentraxin-Domäne war viermal (12%) anwesend und die Lev-, die LH- und die ApicA-Domäne waren jeweils dreimal (9%) an Interaktionen beteiligt. Die Anth- sowie die Fibronectin-(FN2)-Domäne waren jeweils zweimal (6%) anwesend. Die SR-Domäne wurde bereits als peptidligandenbindendes Motiv beschrieben (Whitney *et al.*, 1995; Delrieu *et al.*, 2002; Claudianos *et al.*, 2002). Sie wurde als eine über Disulfidbrücken stabilisierte Strukturkomponente im extrazellulären Teil von membrangebundenen bzw. sekretierten Proteinen gefunden und ist im Tierreich weit verbreitet (Übersichtsartikel Aruffo *et al.*, 1997). In Vertebraten ist sie entweder Teil eines Oberflächenrezeptors von Immunzellen oder Bestandteil sekretierter Proteine, welche an Abwehrmechanismen des Wirts beteiligt sind (Aruffo *et al.*, 1997; Resnick *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1990). Auch in Invertebraten, z.B. in Schwämmen, ist die SR-Domäne Bestandteil von Oberflächenzellrezeptoren, welche Zell-Zell-Kontakte vermitteln (Blumbach *et al.*, 1998). Andere extrazelluläre Proteine von Schwämmen oder Seeigeln, mit einer SR-Domäne, sind mit Coelomozyten, primitiven Immunzellen, und Spermazellen assoziiert (Müller, 1997; Pancer, 2000). Außerdem findet sich die SR-Domäne in Proteinen, die bei der Phagozytose invadierender Pathogene eine Rolle spielen oder regulatorische Funktionen in der Komplementkaskade übernehmen (Goldberger *et al.*, 1987; Elomaa *et al.*, 1998). Die in der Literatur beschriebenen Funktionen von Proteinen mit einer SR-Domäne und die im Rahmen der durchgeführten Affinitätschromatographiestudien gewonnenen Daten legen die Vermutung nahe, dass die PfCCp-Proteine, welche eine SR-Domäne besitzen, an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein könnten.

Von der LCCL-Domäne wurde bisher hingegen nur beschrieben, dass sie Polysaccharidbindungen vermittelt (Muta *et al.*, 1991). Erstmals beschrieben wurde die LCCL-Domäne im so genannten Faktor C, dem Zymogen einer sekretierten Serinprotease des Pfeilschwanzkrebses Limulus (Muta *et al.*, 1991). Später wurde sie ebenfalls als Bestandteil des humanen, kochleären Coch-5b2- sowie des Lungenreifungsproteins Lgl1 der Ratte, der Maus und des Menschen identifiziert (Robertson *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1999). Diesen drei Proteinen verdankt die LCCL-Domäne ihren Namen (Trexler *et al.*, 2000). Der Faktor C in Limulus vermittelt die Bindung des Endotoxins LPS gramnegativer Bakterien. Hierdurch wird eine Koagulationskaskade des Wirtes zur Abwehr der invadierenden Pathogene in Gang gesetzt. Dabei scheint insbesondere die das LCCL-Modul enthaltende N-terminale

Region des Faktors C beteiligt zu sein. Es wird vermutet, dass diese Region die Bindung des Polysaccharids LPS ermöglicht (Nakamura *et al.*, 1988; Muta *et al.*, 1991; Trexler *et al.*, 2000).

Neben dem LCCL-Motiv finden sich im Lungenreifungsprotein Lgl1, noch weitere Domänen, denen eine Beteiligung an antikörperunabhängigen Abwehrmechanismen zugesprochen wird (Niderman *et al.*, 1995; Kjeldsen *et al.*, 1996; Trexler *et al.*, 2000). Humanes Coch-5b2-Protein wird mit der Taubheitsform DFNA9 in Verbindung gebracht. Über die Funktion dieses Proteins ist jedoch nur wenig bekannt. Möglicherweise bindet es an Komponenten der extrazellulären Matrix, da es zwei Regionen, die Homologien zu von-Willebrand-Typ-A-Domänen aufweisen, besitzt (Robertson *et al.*, 1997, 1998). Dem sporozitenspezifischen TRAP- (*Thrombospondin-related anonymous protein*), welches ebenfalls eine von-Willebrand-Typ-A-Domäne besitzt, wird z. B. eine Funktion bei der Interaktion mit dem Heparin der Leberzellen während deren Invasion und damit eine Rolle bei Wirtszellinteraktionen zugesprochen (Übersichtsartikel Sinnis und Coppi, 2007; Moreira *et al.*, 2008). Typ-A-Domänen wurden aber auch in Proteinen gefunden, die das Komplementsystem und das Immunsystem regulieren. Demzufolge könnte Coch-5b2 und damit die LCCL-Domäne auch an immunregulatorischen bzw. an Abwehrmechanismen beteiligt sein (Colombatti und Bonaldo, 1991; Colombatti *et al.*, 1993). Eine detaillierte funktionelle Charakterisierung des LCCL-Motivs in diesen Proteinen steht allerdings noch aus. Die Ergebnisse der angefertigten Affinitätschromatographiestudien deuten darauf hin, dass die LCCL-Domäne nicht nur an Polysaccharidbindungen beteiligt ist, sondern vermutlich ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen vermittelt.

Auch das NEC-Motiv wurde bisher nur als polysaccharidbindende Proteinkomponente beschrieben (Pradel *et al.*, 2004). Dieses Motiv findet sich in den Oberflächenproteinen Neurexin und Kollagen, welche im Tierreich hochkonserviert sind und nach denen es benannt wurde. Die NEC-Domäne wurde erstmals als allein stehendes Motiv im Verlauf der *PfCCp*-Charakterisierung identifiziert und es liegen keine Daten zur genaueren Funktion dieses Motivs vor. Die Resultate der Affinitätschromatographiestudien lassen jedoch auf eine Rolle des NEC-Motivs bei Protein-Protein-Interaktionen schließen.

Über die Bindungseigenschaften der ApicA- und der Pentraxin-Domäne ist bisher nichts bekannt. Die ApicA-Domäne wurde ausschließlich in der *PfCCp*-Familie gefunden (Pradel *et al.*, 2004). Die Pentraxin-Domäne wurde hingegen bereits in einer Proteinfamilie, welche an der Ausbildung einer akuten Immunantwort mittels Agglutination, Komplementaktivierung und Phagozytose beteiligt ist, beschrieben (Bharadwaj *et al.*, 2001; Claudianos *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der hier diskutierten

Affinitätschromatographiestudien deuten darauf hin, dass beide Motive mögliche Bindungsaffinitäten zu Proteinen besitzen. Die Ricin-, die Discoidin- und die Levanase-Domäne sind Module, denen in der Literatur eine Bindungsaffinität zu Polysacchariden zugesprochen wird (Baumgartner *et al.*, 1998; Ponting und Russell, 2000). Der LH-Domäne wird dagegen sowohl eine Beteiligung an Protein-Protein- als auch an Protein-Lipid-Interaktionen zugeschrieben (Bateman und Sandford, 1999; Delrieu *et al.*, 2002; Claudianos *et al.*, 2002).

Die nur in *PfCCp5* und *PfFNPA* enthaltene Fibronectin-(FN2)-Domäne, wurde in Vertebraten beschrieben. Das Fibronectin der Chondrozyten, Endothelzellen und Makrophagen übernimmt eine Art Brückenfunktion durch Bindung von Kollagenfibrillen und anderen Molekülen der extrazellulären Matrix (Steffensen *et al.*, 1995). Die FN2-Domäne von Endothelzellen interagiert hierbei mit Kollagen des Typs I-V und des Typs X (Steffensen *et al.*, 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sie bei der Modifizierung der zellulären Aktivierung der Matrixmetalloproteinase-2, welche an der Spaltung von Kollagen beteiligt ist, eine Rolle spielt (Steffensen *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004). Die Fibronectin-(FN2)-Domäne ist aber auch Bestandteil der Gelatinase A, welche an der Katalyse von Typ-I-Gelatin beteiligt ist (Hornebeck *et al.*, 2005). Sie ist somit an Protein-Protein-Interaktionen, aber auch an der Spaltung von Proteinen beteiligt.

Das Anth-Motiv von *PfCCp5* und *PfFNPA* wurde in bakteriellen Proteinen beschrieben und es wird vermutet, dass es Wirtszellpolysaccharide binden kann (Pradel *et al.*, 2004). So interagiert das sekretorische *Protective-Antigen* (PA) von *Bacillus anthracis* mit Rezeptoren der Wirtszellen. Es bildet auf der Zelloberfläche von Säugerzellen gemeinsam mit dem *Lethal-Factor* (LF) und dem *Edema-Factor* (EF) von *B. anthracis* einen Komplex aus, der mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen wird, wo er seine toxische Aktivität entfaltet (Übersichtsartikel Mourez *et al.*, 2002). Sowohl *PfCCp5* als auch *PfFNPA* könnten aufgrund ihres ähnlichen Domänenaufbaus und ihrer intrazellulären Lokalisation daher maßgeblich für die Ausbildung von Interaktion der *PfCCp*-Proteine untereinander und mit anderen intrazellulären Proteinen bzw. Proteinen der parasitophoren Vakuole verantwortlich sein. Im Hinblick auf die Identifizierung weiterer Interaktionspartner dieser beiden *PfCCp*-Proteine sollten daher Ko-Immunopräzipitationen und Affinitätschromatographiestudien unter Verwendung anderer sexualstadienspezifischer Proteine von *P. falciparum* durchgeführt werden.

Zusammenfassend ließ sich zwar keine eindeutige wechselseitige Interaktion einzelner Motive feststellen, jedoch konnte gezeigt werden, dass die nativen *PfCCp*-Proteine miteinander interagieren und ausgewählte rekombinant exprimierte *PfCCp*-Domänen in direkte Wechselwirkung treten. Der mangelnde Nachweis eindeutiger wechselseitiger

Interaktionen einzelner Domänen könnte möglicherweise Folge der Expression im bakteriellen System in Form von rekombinanten Proteinen sein. Die Auswahl einzelner Domänen zur Generierung artifizieller, rekombinanter Proteine und die Überexpression in *E.-coli*-Zellen kann zu inkorrekten Faltungen führen und damit zu einer Behinderung von Interaktionen zwischen den Domänen. Die Größe der nativen PfCCp-Proteine macht es jedoch unmöglich, das vollständige Transkript in Bakterienzellen zu exprimieren.

Kürzlich konnte die Bindung rekombinanter PfCCp1, PfCCp2 sowie PfCCp3-Proteine, welche bereits in Affinitätschromatographiestudien an direkten Interaktionen beteiligt waren, an *P.-falciparum*-Makrogameten mittels Zelladhäsionsexperimenten gezeigt werden (Simon *et al.*, 2009). Da die Makrogameten von den exflagellierenden Mikrogametozyten befruchtet werden müssen, könnte die Adhäsion der PfCCp-Proteine nach ihrer Freisetzung unterstützende Funktion auf die Befruchtung haben. Die Zelladhäsionsexperimente an fixierten WT-Gametenkulturen wiesen eine Bindung rekombinanter PfCCp-Proteine an ein Viertel der untersuchten Makrogameten auf. An fixierten PfCCp3-KO-Gametenkulturen konnte hingegen keine Bindung der rekombinanten PfCCp-Proteine festgestellt werden. Die Anlagerungsrate der rekombinanten PfCCp-Proteine könnte dabei vom Reifegrad und der damit verbundenen Expression eines adhäsionsvermittelnden Oberflächenproteins der Makrogameten abhängig sein. Die Ausdifferenzierung der Makrogameten während der Gametogenese beträgt etwa 20 Minuten (Lucius und Loos-Frank, 2008). Im Verlauf dieser Zeit müssen neusynthetisierte Proteine nicht nur prozessiert, sondern auch an ihren Zielort transportiert werden. Einen Hinweis auf einen zeitabhängigen Proteintransport während der Gametogenese liefert die Beobachtung, dass Pfs25 vesikulär im Zytoplasma inaktivierter Gametozyten exprimiert wird, in aktivierten Gametozyten jedoch eine beginnende Oberflächenassoziation von Pfs25 detektierbar ist (Scholz *et al.*, 2008). Die Veränderung der PfCCp-Interaktionsrate mit Makrogameten ist daher in Folge einer nicht synchronisierten Reifung während der Gametogenese denkbar. Es ist jedoch auch möglich, dass für eine höhere Anlagerungsrate vollständige, alle Domänen enthaltende PfCCp-Proteine notwendig sind.

Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen jedoch schließen, dass ein Teil der PfCCp-Proteine sowohl durch Wechselwirkungen innerhalb der PfCCp-Familie, als auch mit anderen sexualstadienspezifischen Proteinen eine wichtige Rolle bei der Gametogenese von *P. falciparum* bzw. bei der Befruchtung spielt.

### 4.3 Die Rolle der PfCCp-Proteine während der Fertilisationsprozesse von *P. falciparum* – eine Arbeitshypothese

Die ko-abhängige Expression aller PfCCp-Proteine, die partielle Freisetzung während der Gametogenese und ihre Interaktion untereinander bzw. die teilweise Interaktion mit sexualstadienspezifischen Proteinen wie *Pfs25*, *Pfs230* und *Pfs48/45*, führten in unserer Arbeitsgruppe zur Formulierung einer Hypothese (Abb. 4.3). Diese besagt, dass eine Subpopulation sexuell determinierter Schizonten sich zu Gametozyten entwickelt. An der Regulation dieser Entwicklung könnten frühe sexualstadienspezifische Proteine, wie z. B. *Pfg14.748* aber auch PfCCp5 beteiligt sein. Nach der Differenzierung von Sexualstadien aus asexuellen Blutstadien, dem Abschluss der Gametozytogenese und der Induktion der Gametogenese werden zwei unterschiedliche Prozesse in Gang gesetzt. Ein Prozess beinhaltet das Ausbrechen der Mikrogametozyten aus den Erythrozyten, die anschließende Exflagellation und die Ausbildung von Mikrogameten. Diese nehmen, noch während sie mit dem Restkörper des Mikrogametozyten verbunden sind, Kontakt zu den ihnen sie umgebenden infizierten und uninfizierten Erythrozyten auf und bilden dadurch große lichtmikroskopisch sichtbare Zellkomplexe.

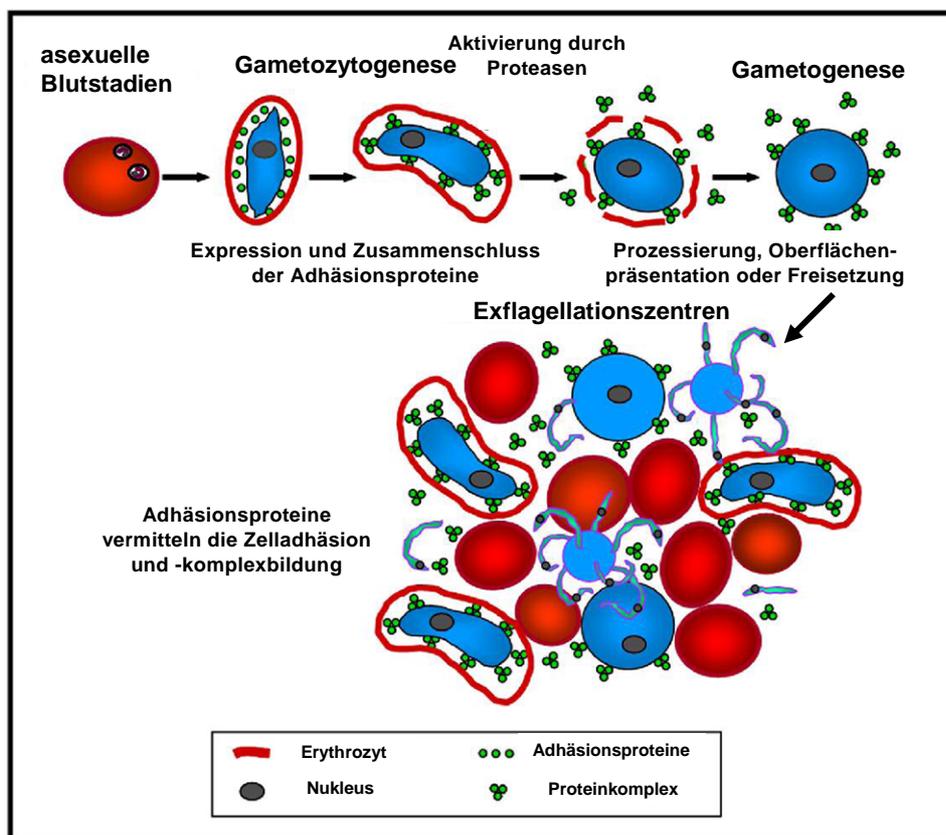


Abb. 4.3. Hypothese zur Komplexbildung sexualstadienspezifischer Proteine von *P. falciparum*.  
Quelle: Simon *et al.*, 2009, verändert.

Gemäß der Hypothese unserer Arbeitsgruppe wird gleichzeitig ein zweiter Prozess, der bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde, ausgelöst. Hierbei übernehmen die Makrogametozyten eine Schlüsselfunktion, denn bei ihrem Ausbrechen aus den Erythrozyten werden sexualstadienspezifische Adhäsionsproteine wie *Pfs25*, *Pfs230*, *Pfs48/45* aber auch einige Mitglieder der *PfCCp*-Familie einzeln bzw. in Form von Proteinkomplexen aus der parasitophoren Vakuole freigesetzt oder an der Oberfläche von Gameten exponiert. Dabei interagieren die *PfCCp*-Proteine innerhalb der parasitophoren Vakuole und während der Freisetzung miteinander sowie möglicherweise mit den anderen freigesetzten oder oberflächenassoziierten sexualstadienspezifischen Proteinen. *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* bilden während dieser Freisetzung eine matrixähnliche Struktur aus, welche aus Erythrozyten, Gametozyten sowie Gameten bestehende Exflagellationszentren umgibt. Diese Vorgänge gehen mit Proteinprozessierungen einher, welche durch Proteasen vermittelt werden. Für *Pfs230* konnte bereits eine solche Spaltung und partielle Freisetzung während der Gametogenese gezeigt werden (Williamson *et al.*, 1996; Brooks und Williamson, 2000). Inhibierungsstudien lassen außerdem die Involvierung einer Reihe von Proteasen bei der Ausbildung von Exflagellationszentren vermuten. Zu diesen könnten Cystein-, Serin-, Aspartat- sowie Metalloproteasen gehören (Torres *et al.*, 2005, Rupp *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte anhand von FP-1-KO-Parasiten bereits gezeigt werden, dass ein Mangel an FP-1 zwar keinen Einfluss auf die Fähigkeit zur Exflagellation der Mikrogameten hat, jedoch auf die Bildung von Oozysten (Eksi *et al.*, 2004). Die meisten Proteasen müssen derzeit allerdings noch hinsichtlich ihrer Funktion charakterisiert werden. Auch *PfCCp5* und *PfFNPA* könnten, aufgrund der oben erwähnten bekannten Funktionen der FN2-Domäne, für die Regulierung der Aktivierung von bspw. Metalloproteasen während der Ausbildung von Exflagellationszentren verantwortlich sein. Hierbei werden sie jedoch nicht wie *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* freigesetzt, sondern verbleiben mit der Oberfläche von Makrogameten assoziiert.

Die Funktion der Protein-Protein-Interaktionen der *PfCCp*-Mitglieder sowie der matrixähnlichen Proteinkomplexe ist bisher noch nicht genau verstanden. Eine mögliche Erklärung für die Bildung einer Matrixstruktur könnte sein, dass eine räumliche Nähe von männlichen und weiblichen Gameten hergestellt werden soll, um die Fertilisation im widrigen Milieu des Mückenmitteldarms zu erleichtern. Der sich erst in der Sporozitenmigration manifestierende Phänotyp *PfCCp2*- bzw. *PfCCp3*-defizienter Parasiten widerspricht jedoch dieser Annahme. Führt allerdings der Mangel eines der *PfCCp*-Proteine zu einer aberrierenden Meiose und einer damit verbundenen anormalen Zellteilung, wäre der späte Phänotyp in der Sporozitenentwicklung

erklärbar. Außerdem könnten die PfCCp-Proteine nach der Befruchtung auch mit dem Kristallkörper des Ookineten assoziieren, der möglicherweise für die Reifung der Sporozoiten in den Oozysten verantwortlich ist, wie es für PbCCp3 bereits berichtet wurde (Carter *et al.*, 2008). Die erst kürzlich in unserem Labor beschriebenen „Nanotubes“ könnten ebenfalls an der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten zwischen Gametozyten und Gameten bzw. zwischen Makro- und Mikrogameten von *P. falciparum* beteiligt sein (Rupp *et al.*, Manuskript eingereicht). Diese teilweise mehr als 100 µm langen, filamentösen Strukturen sind vermutlich Ausstülpungen des Plasmalemmas der Gameten, die während des Ausbrechens aus den Erythrozyten gebildet werden. Die aktinhaltigen „Nanotubes“ besitzen wahrscheinlich adhäsive Eigenschaften, denn sie exprimieren auf ihrer Oberfläche die sexualstadienspezifischen Adhäsionsproteine Pfs230, Pfs48/45, Pfs25 und PfCCp4. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die von den Gameten gebildeten „Nanotubes“ sowohl mit Gametozyten als auch mit Gameten in Ihrer Umgebung in Kontakt treten, jedoch hierbei kein Austausch von Zytoplasma stattfindet. Diese Daten führten zu der Annahme, dass sie an der Ausbildung von Zellaggregaten, bestehend aus Gameten und Gametozyten, beteiligt sind und somit die Wahrscheinlichkeit einer Befruchtung deutlich erhöhen.

Eine mögliche andere Funktion der PfCCp-Proteine könnte die Evasion des Parasiten vor Komponenten des humanen Immunsystems sein. Die in die Mücke aufgenommenen Sexualstadien sind ohne ihre schützende Erythrozytenhülle nicht nur spezifischen Antikörpern, sondern auch Faktoren des humanen Komplementsystems ausgesetzt, welche ebenfalls mit dem Blutmahl aufgenommen werden. Dabei können die Faktoren des humanen Komplementsystems noch mehrere Stunden nach der Blutmahlzeit im Mitteldarm der Mücke aktiv sein (Margos *et al.*, 2001). Um den Angriffen durch die Verdauungsenzyme der Mücke und einer durch das humane Komplementsystem vermittelten Lyse zu entgehen, braucht der Parasit daher ein Schutzschild. Es sind jedoch bisher keine wirtseigenen Moleküle, welche die Transmissionsstadien von *P. falciparum* vor einem Angriff durch das Komplementsystem schützen, bekannt (Margos *et al.*, 2001). Durch Inhibierung von Bindungsstellen oder Maskierung mit Hilfe der PfCCp-Proteine könnte ein Angriff des Parasiten durch das humane Immunsystem und Faktoren der Mücke verhindert werden. Eine besondere Rolle könnten hierbei die SR- und die LCCL-Domäne spielen denen eine Beteiligung bei der Interaktion mit dem Komplementsystem und bei der Immunevasion in anderen Organismen zugesprochen wird (Simon *et al.*, 2009). Es ist bekannt, dass der humane Faktor H Zellen mittels Bindung an ihre Oberfläche vor einem Angriff durch Komponenten des Komplementsystems schützt (Übersichtsartikel

Pangburn, 2000). In ersten Untersuchungen konnte bereits eine Bindung von Faktor H an rekombinant exprimierte *PfCCp*-Proteine und an die Oberfläche von *P. falciparum*-Makrogameten gezeigt werden (N. Simon, unveröffentlichte Daten). Möglicherweise spielen hierbei aber die *PfCCp*-Proteine nur eine redundante Rolle, denn in *PfCCp*-defizienten Parasiten konnte bisher eine Inhibierung der Fertilisation nicht eindeutig bewiesen werden. Würden die *PfCCp*-Proteine die Sexualstadien von *P. falciparum* direkt vor einem Angriff des Komplementsystems schützen, wäre eine Herabsenkung der Fertilisationsrate bei deren Abwesenheit zu erwarten. Neuere Untersuchungen in unserem Labor gaben allerdings erste Hinweise darauf, dass bei Membranfütterungen unter Verwendung von *PfCCp*-KO-Parasiten die Zahl der sich entwickelnden Ookineten reduziert ist (M. Scheuermayer, unveröffentlichte Daten). Damit wäre das bereits beschriebene Fehlen von Speicheldrüsen Sporozoiten ein denkbarer sekundärer Effekt der verminderten Ookinetenzahl bei Membranfütterungen mit *PfCCp*-defizienten Parasiten. Diese Ergebnisse bedürfen jedoch noch einer genaueren Quantifizierung. Ob eine gleichzeitige Ausschaltung mehrerer *PfCCp*-Proteine einen stärkeren Effekt auf die Fähigkeit zur Befruchtung hat, wäre hierbei durch die Generierung von Doppel-KO-Parasiten noch zu prüfen. Bei der oben erwähnten Untersuchung von *PbCCp*/LAP-doppel-KO-Mutanten konnte hingegen keine stärkere Beeinträchtigung der Parasitenentwicklung festgestellt werden (Lavazec *et al.*, 2009). Möglicherweise entstehen aber auch durch die direkte und indirekte Interaktion der *PfCCp*-Mitglieder Proteinkomplexe, welche Rezeptor-Liganden-Funktion oder die Funktion multimerer Liganden übernehmen und eine nachfolgende Signalkaskade induzieren. Die Bindung der *PfCCp*-Proteine an die Sexualstadien von *P. falciparum* könnte eine Signalkaskade in Gang setzen, die der Regulation von Transkriptionsfaktoren dient, welche erst im späteren Verlauf der parasitären Entwicklung, wie z. B. bei der Sporozoitenreifung, aktiviert werden. Die zeitlich verzögerte Manifestation des *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Phänotyps im Sporozoitenstadium wäre demnach auf die Signaltransduktion zurückführbar.

Über derartige Signalkaskaden in der Sexualentwicklung von *Plasmodium* ist bisher nur sehr wenig bekannt. Da die Gamogonie jedoch durch exogene Faktoren induziert wird und diese ins Innere der Parasitenzelle gelangen müssen, ist eine Übermittlung mittels Signalkaskaden unabdingbar (Übersichtsartikel Alano, 2007). Als Auslöser für die Induktion der Sexualstadienentwicklung werden Stressfaktoren durch die Einwirkung des Wirtsimmunsystems, Steroide sowie Kortikosteroide, eine Erhöhung des Retikulozytenspiegels, aber auch die Ausbildung einer Anämie (Trager und Gill, 1992; Lingnau *et al.*, 1993; Motard *et al.*, 1993; Trager *et al.*, 1999; Nacher *et al.*, 2002) diskutiert. Außerdem scheinen ebenfalls vom Parasiten selbst erzeugte Effekte, wie

eine hohe Parasitämie und Hämolyse bzw. autokrine Faktoren (Schneweis *et al.*, 1991; Williams, 1999; Dyer und Day, 2003) Auslöser zu sein. Die damit verbundenen Regulationsmechanismen sind jedoch noch nicht verstanden (Übersichtsartikel Alano, 2007; Pradel, 2007). Bekannt ist allerdings, dass eine Deletion im subtelomeren Bereich des neunten Chromosoms *in vitro* die Reduktion der Gametozytenbildung zur Folge hat (Day *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1994).

Die Exflagellation der Mikrogametozyten wird ebenfalls durch exogene Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören eine Änderung des Kohlenstoffdioxidgehalts der Umgebung, eine Absenkung der Inkubationstemperatur und die Anwesenheit der mückenspezifischen Xanthurensäure sowie *in vitro* eine Erhöhung des pH-Wertes (Nijhout und Carter, 1978; Sinden, 1983; Billker *et al.*, 1997; Billker *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass diese exogenen Faktoren zur Aktivierung von zyklischem GMP sowie zur Induktion kalzium- und phosphoinositolabhängiger Signalkaskaden führen (Kawamoto *et al.*, 1990, 1993; Ogwan'g *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1994). So führt die Aktivierung der kalziumabhängigen Proteinkinase in *P. berghei*, *PbCDPK4*, durch Xanthurensäure zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese Erhöhung des Kalziumspiegels hat Einfluss auf die Regulierung der Replikationsmechanismen der Mikrogameten (Billker *et al.*, 2004). Die exakten Zusammenhänge dieser Abläufe müssen jedoch noch detaillierter erforscht werden. Andere bisher bekannte Kinasen sind *Pbmap-2* (Rangarajan *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005; Tewari *et al.*, 2005), *Pfmap-2* (Dorin *et al.*, 1999; Dorin-Semlat *et al.*, 2007), *Pfnek-1* (Dorin *et al.*, 2001), *Pfnek-3* (Lye *et al.*, 2006, Low *et al.*, 2007), *Pbnek-4* (Khan *et al.*, 2005; Reininger *et al.*, 2005) und *PbCDPK3* (Ishino *et al.*, 2006; Siden-Kiamos *et al.*, 2006). Diese Kinasen übernehmen häufig essentielle Aufgaben in der Sexualphase von Plasmodium. Die *Pbmap-2*-Kinase ist z. B. an der Regulierung der Zytokinese in männlichen Gameten beteiligt. Ihr *P. falciparum*-Homolog *Pfmap-2* wird *in vitro* durch die *Pfnek-3*- und *Pfnek-1*-Kinasen phosphoryliert. Dieselbe Signalkaskade scheint für die Regulation der DNA-Replikation durch die Aktivierung der NIMA-ähnlichen *Pbnek-4*-Kinase in Zygoten verantwortlich zu sein. Die *PbCDPK3*-Kinase ist hingegen für die Motilität und Infektiosität von Ookineten von Bedeutung. Zusammenfassend machen diese Daten deutlich, dass der Regulierung der Sexualentwicklung von *Plasmodium* ein komplexes Netzwerk verschiedener Signalwege zugrunde liegt. Auch die Mitglieder der *PfCCp*-Familie könnten hierbei als extrazelluläre Signalproteine fungieren, indem sie Rezeptor-Liganden-Funktion oder die Funktion multimerer Liganden übernehmen und an Makrogameten binden.

#### 4.4 Das Potential der PfCCp-Proteine als Komponenten für die Entwicklung von TBV zur Bekämpfung der Malaria

Den Sexualstadien von *Plasmodium* wurde von der Forschung lange Zeit wenig Beachtung geschenkt, da ihre Bekämpfung augenscheinlich weder dem Wohl des Patienten zu dienen noch zur Ausrottung des Mückenvektors beizutragen schien. Seit circa zwei Jahrzehnten ist jedoch das wissenschaftliche Interesse an der Sexualphase der Plasmodien für die Entwicklung transmissionsblockierender Strategien bzw. die Entwicklung Transmissionsblockierender Vakzinen (TBV) erwacht (Übersichtsartikel Carter, 2001; Richie und Saul, 2001; Kaslow, 2002; Matuschewski und Müller, 2007; Saul, 2007). Angriffsziele der TBV sind sexualstadienspezifische Parasitenantigene die im Menschen eine spezifische Antikörperreaktion, möglicherweise unter Beteiligung des Komplementsystems, induzieren, um damit die Parasitenentwicklung in der Mücke zu blockieren (Carter *et al.*, 2000; Carter, 2001; Stowers und Carter, 2001; Kaslow, 2002; Saul, 2007). Durch Unterbrechung der parasitären Entwicklung in der Mücke könnte die Ausbreitung der Malaria reduziert oder sogar vollständig unterbunden werden. Für die Herstellung von effektiven TBVs ist die Identifizierung von Proteinen, welche nicht nur in der Sexualphase von *Plasmodium* eine essentielle Rolle spielen, sondern auch als Antigen im menschlichen Zwischenwirt eine ausreichend immunogene Antwort erzeugen, unerlässlich.

Das erste vor circa zwei Dekaden entdeckte sexualstadienspezifische Protein ist *Pfs25* (Vermeulen *et al.*, 1985, 1986; Kaslow *et al.*, 1988). Weitere zehn Jahre später wurde sein Paralog *Pfs28* identifiziert (Duffy und Kaslow, 1997). Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken zeigten bereits, dass die Kombination von Antikörpern gegen *Pfs25* und *Pfs28* die Transmission von *P. falciparum* in Folge einer Unterdrückung der Oozystenbildung vollständig inhibieren (Kaslow *et al.*, 1988; Kaslow, 1997; Duffy und Kaslow, 1997). Die nasale Immunisierung von Mäusen mit *Pfs25* führte sogar zu einem vollständigen Schutz gegen eine Infektion mit *P. falciparum* (Arakawa *et al.*, 2005). Klinische Studien am Menschen zeigten jedoch, dass die Immunisierung mit rekombinant exprimiertem *Pfs25* alleine keine ausreichend immunogene Antwort hervorruft (Kaslow und Shiloach, 1994; Zou *et al.*, 2003). Durch Einsatz geeigneterer Adjuvantien wird derzeit versucht, eine bessere Immunantwort zu erzeugen. Erste Erfolge wurden bei Versuchen mit Rhesusaffen erzielt. Hier konnte eine *Pfs25*-induzierte Immunabwehr die Transmission des Parasiten in der Mücke vollständig blockieren (Wu *et al.*, 2006). Kürzlich gelang es in einer klinischen Studie der Phase I in einem Freiwilligen durch Immunisierung mit rekombinantem *Pfs25*-Protein und unter Verwendung des ISA-51-Monatid-Adjuvanz, eine starke Antikörperreaktion zu induzieren. Nachfolgende Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken mit dem

Antiserum des Probanden führten zu einer 90%igen Reduktion der Infektiösität der Mücken gegenüber *P. falciparum* (Wu *et al.*, 2008).

Ein viel versprechendes sexualstadienspezifisches Protein für die Entwicklung von TBV ist das bereits oben erwähnte *Pfs230* (Rener *et al.*, 1983; Quakyi *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1993, 1995, 1996). Immunseren gegen *Pfs230* können die Infektiösität der Mücken gegenüber *P. falciparum* deutlich absenken (Williamson *et al.*, 1995). Die Inkubation exflagellierender Kulturen mit *Pfs230*-Antiseren in Gegenwart von aktivem Serum kann *in vitro* die Gametenbildung sogar vollständig inhibieren (Read *et al.*, 1994; Healer *et al.*, 1997; Williamson, 2003). Zusätzlich konnte eine durch anti-*Pfs230*-Antikörper hervorgerufene komplementabhängige Lyse von Makrogameten gezeigt werden (Read *et al.*, 1994). Das *Pfs230*-Protein hat wahrscheinlich eine essentielle Funktion bei der Reifung männlicher Gametozyten, denn männliche *Pfs230*-KO-Parasiten können zwar noch exflagellieren, ihre Fähigkeit an Erythrozyten zu binden ist jedoch signifikant reduziert. Folge dieser mangelnden Fähigkeit zur Bildung von Exflagellationszentren könnte die anschließende verminderte Oozystenbildung sein (Eksi *et al.*, 2006). Bei DNA-Vakzinierungen von Mäusen vermittelte die Region C, welche ein cysteinreiches Motiv enthält und an einem GPI-Anker gekoppelt wurde, die Induktion eines hohen IgG-Spiegels (Bustamante *et al.*, 2000; Fanning *et al.*, 2003). Das *Pfs48/45*-Protein ist ebenfalls ein potentieller Kandidat für die Entwicklung von TBV (Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Kocken *et al.*, 1993). Dieses Protein ist wie bereits erwähnt über einen GPI-(*glycosyl phosphatidyl inositol*)-Anker mit der Zelloberfläche des Parasiten verbunden (Kumar und Wizel, 1992) und bildet zusammen mit *Pfs230* einen Komplex auf der Plasmamembran der Gametozyten (Kumar 1987; Kumar und Wizel, 1992). Bei *Pfs48/45*- und *Pb48/45*-KO-Mikrogameten ist hingegen die Motilität und die Fähigkeit Makrogameten zu befruchten stark eingeschränkt (van Dijk *et al.*, 2001). In Mäusen kann eine Region bestehend aus zehn Cysteinen des *Pfs48/45*-Proteins eine starke Immunreaktion hervorrufen und die gebildeten Antikörper zeigen eine transmissionsblockierende Wirkung (Outchkourov *et al.*, 2007, 2008). In Feldstudien konnte außerdem gezeigt werden, dass Malariapatienten Antikörper gegen *Pfs230* und gegen *Pfs48/45* bilden (Williamson, 2003).

Ein weiteres sexualstadienspezifisches Protein, *Pfs16*, weist ebenso Potential als Komponente für TBV auf. *Pfs16* wird bereits ab dem Stadium I der Gametozytogenese in der Membran der parasitophoren Vakuole exprimiert (Moelans *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 1994; Bruce *et al.*, 1994). Anhand von *Pfs16*-defizienten Parasiten konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit dieses Proteins zu einer Reduktion der

Gametozytenbildung und der Exflagellationsrate männlicher Gametozyten führt (Kongkasuriyachai *et al.*, 2004).

Ein in den Mikronemen von Ookineten exprimiertes Protein ist *PCTRP*, das eine essentielle Rolle bei der Infektiosität von Ookineten spielt (Trottein *et al.*, 1995). *PCTRP*-KO-Parasiten sind nicht befähigt das Mitteldarmepithel der Mücke zu durchdringen und können keine Oozysten ausbilden (Templeton *et al.*, 2000; Dessens *et al.*, 1999; Yuda *et al.*, 1999). Auch *PCHT1*-defiziente Parasiten weisen eine reduzierte Infektiosität der Oozysten auf (Tsai *et al.*, 2001; Dessens *et al.*, 2001). Darüber hinaus zeigte sich, dass Antikörper gegen das *PfCHT1*-Protein die Transmission des Parasiten in der Mücke inhibieren (Li *et al.*, 2005). Die Ausschaltung der Proteine *PbMOAP/PbLP3*, *PbPLP5*, *WARP* und *PbSOAP* führt zu einem ähnlichen Phänotyp (Kadota *et al.*, 2004; Ecker *et al.*, 2007; Yuda *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Dessens *et al.*, 2003).

Weitere sexualstadienspezifische Proteine, die gegenwärtig auf ihr Potential als Komponenten für TBV untersucht werden, sind *PfMR5*, *Pfpeg3* sowie *Pfpeg4* (Eksi und Williamson, 2002; Silvestrini *et al.*, 2005; Lanfracotti *et al.*, 2007). In *Pfpeg3*-KO-Parasiten ist die Zahl der Exflagellationszentren reduziert und die intrazellulären Membransysteme der männlichen Gameten weisen eine abnormale Struktur auf. Daher wird vermutet, dass *Pfpeg3* für eine normale Entwicklung der Mikrogameten unerlässlich ist. Über die Funktion von *Pfpeg4* ist bisher nichts bekannt. Vermutlich handelt es sich bei dem in Gametozyten des Stadium II exprimierten Protein um ein integrales Membranprotein der parasitophoren Vakuole (Alano, 2007).

Die Mitglieder der *PfCCp*-Proteinfamilie besitzen multiple Adhäsionsdomänen, welche hochkonserviert sind (Templeton *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2004; Pradel und Templeton, 2006). Innerhalb des Stammes der Apikomplexa wurden orthologe Proteine in *Cryptosporidium parvum*, *Theileria annulata*, *Toxoplasma gondii* aber auch in *Plasmodium chabaudii*, *Plasmodium knowlesi* und in *Plasmodium yoelii* gefunden (Claudianos *et al.*, 2002; Delrieu *et al.*, 2002; Dessens *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2004). Für *PfCCp2* und *PfCCp3* konnte bereits gezeigt werden, dass beide Proteine eine essentielle Funktion während der Parasitenentwicklung in der Mücke haben. Somit liegt die Vermutung nahe, auch die anderen *PfCCp*-Mitglieder könnten eine wichtige Funktion für die Vollendung des Lebenszyklus von *P. falciparum* haben. Alle *PfCCp*-Proteine werden, mit Ausnahme von *PfCCp5*, ausschließlich in den Sexualstadien des Parasiten exprimiert und während der Gametogenese wird ein Teil dieser Proteine freigesetzt. Die freigesetzten *PfCCp*-Proteine sind an der Ausbildung multimerer Proteinkomplexe beteiligt. Diese Daten lassen darauf schließen, dass ausgewählte Mitglieder der *PfCCp*-Familie ein viel versprechendes Potential als Komponenten für

die Entwicklung von TBV besitzen. Die kürzlich gezeigte signifikante Inhibition einer Ausbildung von Exflagellationszentren durch Inkubation von WT-Gametozytenkulturen mit Antikörpern gegen *PfCCp1*, *PfCCp2*, *PfCCp3*, *PfCCp4* und *PfFNPA* unter Beteiligung des Komplementsystems *in vitro*, (Scholz *et al.*, 2008) deutet auf eine weitere entscheidende Rolle der *PfCCp*-Proteinfamilie während der Fertilisation hin. Dies korreliert mit den Daten für *Pfs230* (Read *et al.*, 1994; Healer *et al.*, 1997; Williamson, 2003). Der inhibitorische Effekt wird sogar unter Verwendung von Antikörpern gegen *Pfs230* in Anwesenheit von aktivem Serum in *PfCCp4*-KO-Parasiten so weit verstärkt, dass eine Exflagellation gänzlich unterbunden ist (Scholz *et al.*, 2008). Es ist denkbar, dass *Pfs230* bei Abwesenheit von *PfCCp4* besser zugänglich ist für spezifisch gegen dieses Protein gerichtete Antikörper. Die Blockierung der Bildung von männlichen Gameten durch anti-*PfCCp*-Antikörper bestätigt das Potenzial einzelner *PfCCp*-Proteine als Komponenten für die Entwicklung von TBV.

Wie bereits zuvor erwähnt konnte gezeigt werden, dass gegen *PfFNPA* gerichtete Antikörper in Anwesenheit des Komplementsystems *in vitro* die Exflagellationsrate von männlichen Gameten teilweise vermindern (Scholz *et al.*, 2008). Daher könnte auch *PfFNPA* als Komponente im Hinblick auf die Entwicklung von TBV ein gewisses Potential besitzen. Die tatsächliche Rolle von *PfFNPA* während der Sexualphase des Erregers und bei der Befruchtung in der Mücke muss aber noch detaillierter untersucht werden. Dagegen scheint *PfCCp5* als TBV-Komponente nicht geeignet zu sein, da Antiseren gerichtet gegen *PfCCp5* weder eine inhibitorische Wirkung auf entstehende Exflagellationszentren hat, noch eine Freisetzung des Proteins nachgewiesen werden konnte. Auch der oben diskutierte, sich offensichtlich bereits in den Blutstadien des Erregers manifestierende, Phänotyp spricht gegen eine essentielle Rolle von *PfCCp5* während der Befruchtung in der Mücke und damit gegen ein Potential des Proteins zur Transmissionsblockierung von *P. falciparum*. Die vorliegenden Daten zur möglichen Funktion der *PfCCp5* und *PfFNPA* stellen jedoch eine wichtige Grundlage für eine detailliertere Analyse und Charakterisierung dieser Proteine, um ihre Rolle während der Sexualphase von *P. falciparum* besser zu verstehen und die Eignung ausgewählter *PfCCp*-Mitglieder als TBV-Untereinheiten zu evaluieren, dar.

#### **4.5 Einfluss der 1,4-Benzodiazepin- sowie der Etacrynsäure-derivate auf asexuelle *P.-falciparum*-Blutstadien**

Immer zahlreichere Resistenzen gegen gängige Antimalariamedikamente aber auch teilweise starke Nebenwirkungen der zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika veranlassen zu einer intensiven Forschung nach neuen therapeutischen Angriffszielen

zur Entwicklung wirkungsvollerer Medikamente gegen Malaria. Die derzeit erhältlichen Malariamedikamente werden in die vier Wirkstoffklassen der 4-Aminoquinoline, 8-Aminoquinoline, Folatantagonisten und Arylaminoalkohole eingeteilt (Übersichtsartikel Schlitzer, 2007, 2008; Greenwood *et al.* 2008). Darüber hinaus werden aber auch Inhibitoren der Atmungskette sowie Antibiotika und das kürzlich erst wiederentdeckte Artemisinin bzw. dessen Derivate zur Therapie von Malaria eingesetzt (Owusu-Agyei *et al.*, 2008). Zu den bekanntesten Malariamedikamenten zählen Chloroquin und Amodiaquin, welche die Hämdetoxifikation asexueller Blutstadien inhibieren, Primaquin und Tafenoquin, die gegen asexuelle Leberstadien gerichtet sind, Quinin und Quininderivate wie z. B. Lumefantrin, die in Kombination mit den Antibiotika Clindamycin, Doxycyclin, und Tetracyclin zur Therapie eingesetzt werden und Pyrimethamin sowie Sulfadoxin, welche die Pyrimidinsynthese blockieren (Saliba *et al.*, 1998; Ramharter *et al.*, 2002, Schlitzer, 2007, 2008).

Gegen die meisten dieser vielfach eingesetzten Therapeutika bestehen jedoch weit verbreitete Resistenzen. In Tansania bestehen sogar bereits Resistenzen gegen alle bekannten Malariamedikamente (Schönfeld *et al.*, 2007). Ursächlich für die Ausbildung von Resistenzen sind entweder Mutationen im Genom des Erregers, die die Zielstruktur des Wirkstoffes so verändern, dass dieser nicht mehr erkannt wird oder Punktmutationen in den Transportern, welche das Chemotherapeutikum in die Zelle bzw. Nahrungsvakuole ein- und ausschleusen (Schlitzer, 2007). So liegt die Ursache für die Resistenz des Erregers gegen Chloroquin, Quinin, Halofantrin und Artemisinin in einer Punktmutation der kodierenden Sequenz des *PfCRT*-(*Chloroquine resistance transporter*)-Gens begründet (Vaderramos und Fidock, 2006). Durch diese Mutation wird das Chloroquin aus der Nahrungsvakuole des Parasiten ausgeschleust und kann so nicht mehr seine volle Wirkung, welche auf der Inhibierung des Hämoglobinabbaus durch die Blutstadien des Parasiten basiert, entfalten. Punktmutationen im *PfMDR1*-(*multidrug resistance 1*)-Gen sind hingegen verantwortlich für die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Mefloquin, Halofantrin, Lumefantrin und Quinin (Vaderramos und Fidock, 2006). Infolge dieser Mutation liegt eine erhöhte Anzahl an Kopien des *PfMDR1*-Gens vor. Diese erhöhte Kopienzahl führt letztlich zu einem vermehrten Einbau von *PfMDR1*-Transportern in die Membran der Nahrungsvakuole. Dadurch werden die Arylamino-alkohole Mefloquin, Halofantrin, Lumefantrin und Quinin aus dem Zytoplasma, ihrem eigentlichen Wirkungsort, in die Nahrungsvakuole geschleust. Der exakte Wirkmechanismus der Arylaminoalkohole ist bisher nicht bekannt. Es wird aber vermutet, dass sie die Fusion von Hämoglobintransportvesikeln mit der Membran der Nahrungsvakuole durch Unterbindung der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verhindern (Fitch, 2004). Die Mutation des *PfMDR1*-Gens entsteht vermutlich als Folge einer

Kompensation einer verringerten Sensitivität von Plasmodienstämmen gegenüber Chloroquin. Mutationen im *PfATP6*-Gen sind dagegen verantwortlich für die Resistenz der Plasmodienstämmen gegenüber Artemisinin (Schlitzer, 2007). Die *PfATP6*-Pumpe ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Pumpe des Endoplasmatischen Retikulums. Auch der exakte Wirkmechanismus von Artemisinin und seinen Derivaten ist noch nicht bekannt. Derzeit wird jedoch eine Eisen-(II)-vermittelte Bildung von Radikalen im Zytoplasma des Parasiten, welche die *PfATP6*-Pumpe inhibieren, infolge von Artemisinineinwirkung diskutiert (Krishna *et al.*, 2006).

Viel versprechende neue Angriffspunkte für die Entwicklung von Chemotherapeutika sind die Cysteinproteasen Falcipain-2 (FP-2) und Falcipain-3 (FP-3) von *P. falciparum*. Sie gehören dem Clan CA der Papain-Familie C1 an (Übersichtsartikel Rosenthal, 2004). Beide Enzyme lokalisieren in der Nahrungsvakuole der asexuellen Blutstadien des Parasiten und werden in den metabolisch am höchsten aktiven Trophozoiten-Stadien des Erregers maximal exprimiert und aktiviert. Dabei ist wahrscheinlich FP-2 für über 90% der Cysteinprotease-Aktivität in Trophozoiten verantwortlich (Shenai *et al.*, 2000). Sowohl FP-2 als auch FP-3 wird eine Rolle bei der Hämoglobinhydrolyse zugesprochen, da sie *in vitro* in saurem Milieu Hämoglobin spalten (Shenai *et al.*, 2000; Sijwali *et al.*, 2001; Hanspal *et al.*, 2002). Durch Aufklärung der Kristallstruktur von FP-2 ist es gelungen, ein Hämoglobin bindendes Motiv in der Tertiärstruktur dieses Proteins zu identifizieren (Hogg *et al.*, 2006; Abb. 4.4).

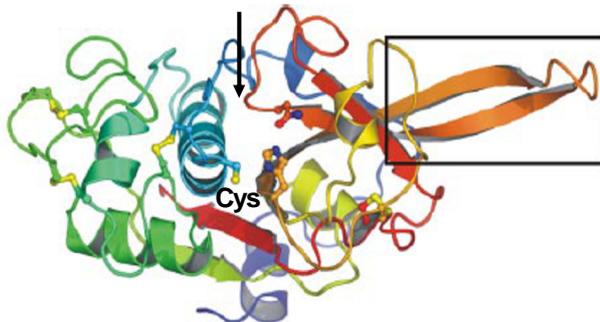


Abb. 4.4. Tertiärstruktur von FP-2. Eine Haarnadelstruktur (schwarzer Kasten) außerhalb des aktiven Zentrums (schwarzer Pfeil) bindet Hämoglobin und Cystein (Cys) hydrolysiert es. Quelle: Hogg *et al.*, 2006, verändert.

Die Inkubation von *P.-falciparum*-Blutstadien *in vitro* mit den Cysteinprotease-Inhibitoren E64 bzw. Leupeptin hemmt den Hämoglobinabbau und es kommt zum Absterben der Parasiten (Dluzewski *et al.*, 1986; Rosenthal *et al.*, 1988; Bailly *et al.*, 1992). Neuere Daten deuten darauf hin, dass der Abbau von Hämoglobin zur Bereitstellung von für den Parasiten essentieller Aminosäuren wahrscheinlich über eine Hydrolysekaskade unter Beteiligung verschiedener Proteasen stattfindet (Coombs *et al.*, 2001; Drew *et al.*, 2008). An dieser Kaskade sind, neben FP-2 und -3, auch die Plasmepsine, so genannte Aspartatproteasen, sowie die Metalloprotease Falcilysin beteiligt. Vermutlich werden die Plasmepsine durch die Falcipaine FP-2, FP-2' und

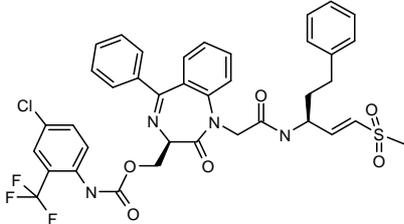
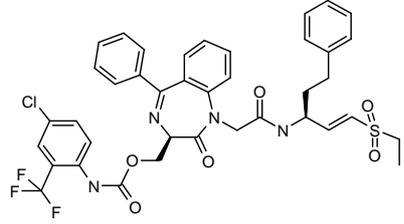
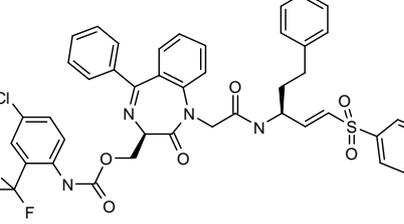
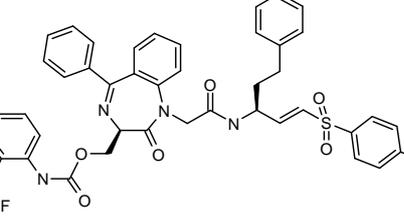
FP-3 aktiviert, wodurch der hydrolytische Abbau des Hämoglobins in Gang gesetzt wird (Drew *et al.*, 2008). Darüber hinaus sind FP-2 und FP-3 wahrscheinlich an der Erythrozyten-Ruptur beim Ausbrechen der reifen Parasiten aus den roten Blutzellen beteiligt (Raphael *et al.*, 2000; Dua *et al.*, 2001).

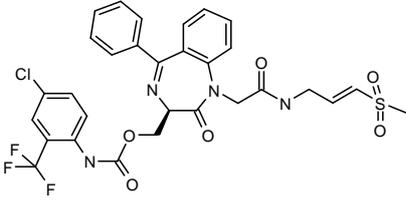
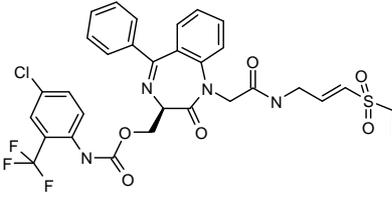
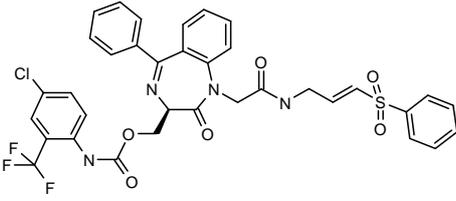
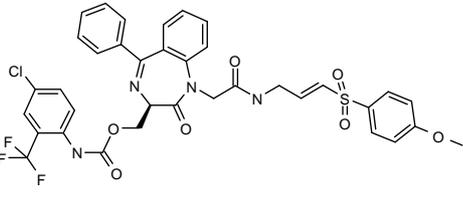
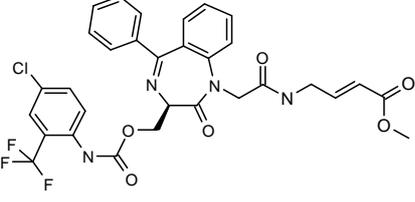
Die meisten Cysteinproteaseinhibitoren leiten sich entweder von einem natürlichen Substrat oder von einem natürlich vorkommenden peptidischen Inhibitor des Enzyms ab (Übersichtsartikel Otto und Schirmeister, 1997; Powers *et al.*, 2002). Diese peptidischen Inhibitoren können jedoch leicht selbst von Proteasen hydrolysiert werden. Daher ist das Ziel aktueller Forschung die Entwicklung von Inhibitoren, welche ein peptidomimetisches Gerüst besitzen (Übersichtsartikel Powers *et al.*, 2002). Diese so genannten Peptidomimetika können durch die Modifikation der AS-Seitenketten oder durch den Einbau unnatürlicher, proteinogener Aminosäuren nicht mehr hydrolysiert werden (Ponte-Sucre *et al.*, 2006; Micale *et al.* 2006; Ettari *et al.*, 2007). Durch Kopplung des peptidomimetischen Gerüsts an ein elektrophiles „warhead“ kann der Inhibitor das Enzym selektiv am Cystein des aktiven Zentrums angreifen und hemmen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Gruppe der Peptidomimetika, basierend auf dem Grundgerüst von 1,4-Benzodiazepin, *in vitro* auf ihre Antimalaria-aktivität durch Bestimmung der Umsatzrate der Lactatdehydrogenase von *P. falciparum* im Mikrodilutionsverfahren getestet (Makler und Hinrichs, 1993, 1998; Micale *et al.*, 2006). Die getesteten peptidomimetischen Inhibitoren besitzen einen Vinylsulfonrest, der kovalent an das Thiol des Cysteins im aktiven Zentrum bindet und das Enzym somit irreversibel hemmt (Shenai *et al.*, 2003; Ettari *et al.*, 2007). Durch Variationen der Seitenketten des Vinylsulfonrests sollte eine bessere Passgenauigkeit des Inhibitors in die Bindetasche des Enzyms erzielt werden. Ebenso wie die halbmaximale Hemmung des Wachstums asexueller *P.-falciparum*-Blutstadien des Stammes 3D7 wurde auch die inhibitorische Wirkung dieser Peptidomimetika an rekombinant exprimierten FP-2, durch Messung der Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ( $k_{2nd}$ ) der Inaktivierung des Enzyms, bestimmt (Ettari *et al.*, 2007).

Zur Evaluierung der selektiven Aktivität der peptidomimetischen Inhibitoren gegenüber der parasitären Cysteinprotease FP-2 wurden diese zusätzlich an den humanen, rekombinant exprimierten Cysteinproteasen Cathepsin B (CB) und L (CL) getestet (Ettari *et al.*, 2007). Diese beiden Cysteinproteasen gehören ebenfalls der Papainfamilie an und im Falle einer spezifischen Aktivität der peptidomimetischen Inhibitoren gegenüber FP-2 sollten diese keine hemmende Wirkung auf die humanen CB- und CL-Proteasen haben. Die Messungen der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung ( $k_{2nd}$ ) der Inaktivierung der CB- und CL-Enzyme ergaben einen um das 1-2-fache geringeren Wert, als für FP-2 gemessen wurde, so dass von einer

selektiven Aktivität der getesteten Inhibitoren gegenüber FP-2 ausgegangen werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen halbmaximalen Hemmkonzentrationen ( $IC_{50}$ ) an dem Plasmodienstamm 3D7 sind noch einmal in Tab. 4.2 zusammengefasst und den Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung ( $k_{2nd}$ ) von FP-2, CB und CL gegenübergestellt. Hierbei gibt ein höherer  $k_{2nd}$ -Wert eine bessere Inhibition des Enzyms an als ein niedrigerer  $k_{2nd}$ -Wert.

Tab. 4.2. Vergleich der  $IC_{50}$ -Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] der an *P.falciparum*-3D7-Blutkulturen getesteten Peptidomimetika mit den  $k_{2nd}$ -Werten [ $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ] von rekombinant exprimiertem FP-2, CB und CL (k. I., keine Inhibierung; n. b., nicht bestimmt)

Substanzbezeichnung und Strukturformel	3D7 $IC_{50}$	FP-2 $k_{2nd}$	CB $k_{2nd}$	CL $k_{2nd}$
P-1a 	55,4	432	4,4	3,5
P-1b 	9,1	307	10,3	7,3
P-1c 	13,5	175	11,5	16,5
P-1d 	59,6	634	13,7	1,0

Substanzbezeichnung und Strukturformel	3D7 IC <sub>50</sub>	FP-2 <i>k</i> <sub>2nd</sub>	CB <i>k</i> <sub>2nd</sub>	CL <i>k</i> <sub>2nd</sub>
<p>P-2a</p> 	18,1	161	6,6	0,88
<p>P-2b</p> 	56,5	248	11,7	1,0
<p>P-2c</p> 	64,3	243	12,6	7,5
<p>P-2d</p> 	< 100	291	10,0	7,6
<p>P-2e</p> 	k. l.	n. b.	n. b.	n. b.

Die peptidomimetischen Inhibitoren P-1a bis P-1d wurden alle in Position P1 (siehe Kap. 1.5.3) mit einer Phenylalanin-Seitenkette ausgestattet. Die peptidomimetischen Inhibitoren P-2a bis P-2e besitzen hingegen in Position P1 einen Glyzinrest. Beim Vergleich dieser beiden Inhibitor Klassen anhand der zugehörigen gemessenen Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung (*k*<sub>2nd</sub>) von FP-2 wird deutlich, dass die Substituenten in P1 einen Einfluss auf die Inhibitions geschwindigkeit des Enzyms

haben. So zeigt z. B. P-2a eine fast um das Dreifache niedrigere Inhibitions-  
geschwindigkeit als sein Struktur analog P-1a. Der positive Einfluss von Phenylalanin-  
Seitenketten auf die Hemmung der enzymatischen Aktivität von FP-2 wurde bereits  
berichtet (Shenai *et al.*, 2003). Der Vinylsulfonrest aller Inhibitoren trägt in P1'  
verschiedene aromatische und aliphatische Substituenten, um die Relevanz der Größe  
und der Charakteristik dieses Rests für die Aufnahme in die lipophile Bindetasche des  
Enzyms zu evaluieren. Die Anfügung eines Methoxyrests an Position P1' scheint sich  
hierbei positiv auf die Inhibierung der enzymatischen Aktivität, wie es bei den  
Struktur analogen P-1d und P-2d der Fall ist, auszuwirken. Die generell niedrigen  
 $k_{2nd}$ -Werte der getesteten peptidomimetischen Inhibitoren von rekombinant  
exprimiertem CB und CL deuten auf eine Selektivität gegenüber FP-2 hin. Auch wenn  
die antiplasmodiale Aktivität dieser Peptidomimetika nicht direkt mit den inhibitorischen  
Wirkungen auf FP-2 vergleichbar ist, so bestätigen doch die gemessenen  $IC_{50}$ -  
Konzentrationen den positiven Einfluss der Anwesenheit einer Phenylalanin-  
Seitenkette auf die Hemmwirkung der Inhibitoren.

Eine Verbesserung der antiplasmodialen Aktivität durch Anfügung eines Methoxyrests  
an Position P1' war allerdings nicht zu verzeichnen. Eine mögliche Erklärung der  
vergleichsweise schwachen Aktivität gegenüber *P.-falciparum*-3D7-Blutstadien *in vitro*  
könnte die begrenzte Zugänglichkeit der intrazellulär in der Nahrungsvakuole der  
Parasiten lokalisierten FP-2 Cysteinprotease sein. Vergleicht man jedoch die  
gemessenen  $IC_{50}$ -Konzentrationen der Peptidomimetika mit dem Literaturwert von E64  
( $IC_{50} = 5,3 \mu M$ ), einem bekannten Inhibitor plasmodialer Cysteinproteasen, so wird  
deutlich, dass insbesondere die P-1b und P-1c eine signifikante antiplasmodiale  
Aktivität besitzen (Schulz *et al.*, 2007). Ebenso bestätigt das Fehlen der Vinylsulfon-  
gruppe des Inhibitors P-2e und die damit verbundene mangelnde Hemmwirkung auf  
*P.-falciparum*-3D7-Blutstadien die essentielle Rolle dieser elektrophilen Kopfgruppe bei  
der Blockierung der enzymatischen Fähigkeiten von FP-2 bzw. des parasitären  
Wachstums. Zusammenfassend weisen die oben diskutierten Peptidomimetika auf  
Basis von 1,4-Benzodiazepin eine selektive und irreversible inhibitorische Aktivität  
gegenüber rekombinant exprimiertem FP-2 sowie *in vitro* eine signifikante  
antiplasmodiale Wirkung auf. Die Peptidomimetika P-1b und P-1c, welche die besten  
inhibitorischen Eigenschaften und die höchste Aktivität gegenüber *P.-falciparum*-3D7-  
Blutstadien aufwiesen, wurden daher als Leitstrukturen für die Entwicklung weiterer  
Inhibitoren ausgewählt.

Nichtpeptidische Inhibitoren sind eine weitere Klasse von Cysteinproteaseinhibitoren, von denen es derzeit, im Vergleich zu den peptidischen, nur sehr wenige gibt (Übersichtsartikel Schirmeister und Kaepler, 2003; Kaepler und Schirmeister, 2005; Ettari *et al.*, 2008; Vale *et al.*, 2008). Etacrynsäure besitzt ein  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Keton und sollte daher analog zu den Vinylsulfonen in der Lage sein, Cysteinproteasen durch eine Michael-Reaktion zu inaktivieren. Sie ist ein bekanntes Schleifendiuretikum (Hydromedin<sup>®</sup>) und ein schwacher Papain-Inhibitor, wie anhand eines Screenings gezeigt werden konnte (Kaepler und Schirmeister, 2005). Die Etacrynsäure wirkt hierbei wahrscheinlich als „Prodrug“, sodass erst der Phase-II-Metabolit, ein Cystein-Konjugat, seine diuretische Wirkung in der Niere entfaltet (Palfrey *et al.*, 1993). Man vermutet, dass dieses Konjugat einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie das unter dem Handelsnamen Lasix<sup>®</sup> erhältliche Schleifendiuretikum, welches zum Furosemid-Typ zählt, besitzt. Schleifendiuretika vom Furosemid-Typ hemmen den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transporter im aufsteigenden Schleifenschenkel von der Lumenseite her und verhindern so die Resorption von Kalium-, Natrium- und Chloridionen. Eine hohe Affinität des Cystein-Konjugats der Etacrynsäure zu diesem Transporter wurde *in vitro* bereits nachgewiesen. Des Weiteren hat die Gabe von Etacrynsäure eine Erniedrigung der Blutviskosität bei Sichelzellanämie zur Folge, da sie die Erythrozytenmembran durchquert und kovalent an Sichelzelloxyhämoglobin bindet, wodurch dieses Polymer destabilisiert und die Blutviskosität erniedrigt wird (Kennedy *et al.*, 1984). Durch allosterische Bindung dieses Moleküls an Hämoglobin erhöht es dessen Affinität zu Sauerstoff. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Etacrynsäure und mögliche -derivate geeignet sein könnten, gezielt die erythrozytären Stadien von *P. falciparum* in der Wirtszelle zu erreichen, um dort ihre antiplasmodiale Wirkung durch Hemmung der parasitären Cysteinproteasen zu entfalten. Es wurde außerdem berichtet, dass Etacrynsäure ein Inhibitor der Asparagin-Synthetase ist, welche ebenfalls einen Cysteinrest im aktiven Zentrum besitzt (Jayaram *et al.*, 1975). Ein Inhibitorscreening an Papain zeigte, dass Etacrynsäure und verschiedene Derivate eine inhibitorische Wirkung auf Cysteinproteasen haben (Kaepler und Schirmeister, 2005). Darüber hinaus konnte eine hemmende Wirkung dieser Derivate auf die SARS-M<sup>pro</sup>-Hauptprotease von Coronaviren festgestellt werden (Kaepler *et al.*, 2005). Daher diene die Etacrynsäure als Leitstruktur für die Entwicklung neuer nichtpeptidischer Cysteinproteaseinhibitoren.

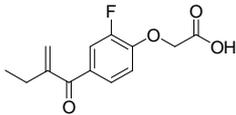
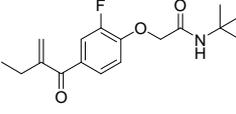
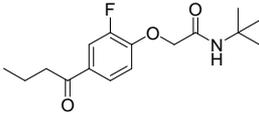
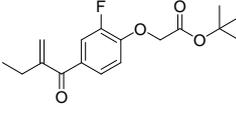
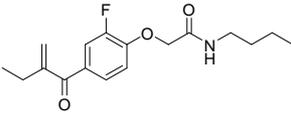
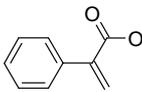
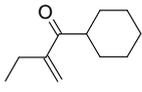
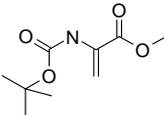
Durch Veränderung des Substitutionsmusters des aromatischen Ringes der Etacrynsäure an unterschiedlichen Positionen bzw. der Synthese von Derivaten mit einer Einfachbindung anstelle der aktivierenden Doppelbindung des  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Systems, wurden bereits nähere Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen

gegenüber den Cysteinproteasen Papain, FP-2 und FP-3 gewonnen (Kaepler und Schirmeister, 2005; Dude *et al.*, 2008). Der genaue Wirkungsmechanismus der niedermolekularen Etacrynsäure auf die Cysteinproteasen der Nahrungsvakuole von *P. falciparum* ist jedoch noch nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Teil dieser bereits an rekombinant exprimiertem FP-2 und FP-3 getesteten Etacrynsäurederivate auf ihre antiplasmodiale Aktivität *in vitro* untersucht. Hierbei wurde, ebenso wie bei den oben diskutierten Peptidomimetika der chloroquinsensitive *P.-falciparum*-Stamm-3D7 verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen halbmaximalen Hemmkonzentrationen ( $IC_{50}$ ) der Etacrynsäurederivate unter Verwendung asexueller 3D7-Blutstadien sind in Tab. 4.3 aufgelistet und den Hemmkonzentrationen von rekombinant exprimiertem FP-2 und FP-3 gegenübergestellt.

Bei den in der vorliegenden Arbeit getesteten Etacrynsäurederivaten ist entweder durch Austausch der beiden Chloratome durch ein Fluor- und ein Wasserstoffatom das Substitutionsmuster des aromatischen Ringes verändert worden (E-1 bis E-5), oder die synthetisierten Derivate sind so modifiziert worden, dass sie lediglich noch eine Etacrynsäurepartialstruktur besitzen (E-6 bis E-8). Fluor hat eine stärkere elektronenziehende Eigenschaft als Chlor und es sollte untersucht werden, ob diese Derivate dadurch besser kovalent an das aktive Zentrum von Cysteinproteasen binden können. Durch Eliminierung der reaktiven Doppelbindung (E-3) sollte der Einfluss des  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Systems auf die inhibitorischen Eigenschaften evaluiert werden. Die Anfügung eines Esters (E-4) oder eines Amids (E-2, E-3 und E-5), könnte zu einer besseren Passgenauigkeit in die Bindetasche der Enzyme führen, wie Dockingstudien vermuten ließen (Kaepler *et al.*, 2005). Zur Untersuchung der Relevanz des aromatischen Ringes wurde dieser durch einen cycloaliphatischen Rest ausgetauscht (E-6 und E-7) bzw. eliminiert (E-8).

Insgesamt wiesen die untersuchten Etacrynsäurederivate eine nur geringe Hemmwirkung auf rekombinant exprimiertes FP-2 und FP-3 auf. Der in der Literatur beschriebene Referenzwert der halbmaximalen Hemmung des Cysteinprotease-Inhibitors E64 beträgt  $0,015 \mu\text{M}$  für FP-2 und  $0,075$  für FP-3 (Schulz *et al.*, 2007). Die beste Hemmwirkung an rekombinantem FP-2 zeigten die Derivate E-2 und E-3. Keine Hemmwirkung zeigte hingegen das acylierte Anisol E-7 an rekombinant exprimiertem FP-3. Aufgrund der geringen Inhibition von FP-2 wurden die restlichen hier diskutierten Derivate nicht an FP-3 getestet. Auch die antiplasmodiale Aktivität *in vitro* an dem *P.-falciparum*-3D7-Stamm war verglichen mit der  $IC_{50}$ -Konzentration von Chloroquin ( $0,0038 \mu\text{M}$ ), welches als Referenz diente, eher gering. Die beste antiplasmodiale Aktivität zeigte das acylierte Anisol E-6.

Tab. 4.3. Vergleich der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen [μM] der an *P.-falciparum*-3D7-Blutkulturen getesteten Etacrynsäurederivate mit den IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von rekombinant exprimiertem FP-2 und FP-3 (k. l., keine Inhibierung; n. b., nicht bestimmt)

Substanzbezeichnung und Strukturformel	3D7 IC <sub>50</sub>	FP-2 IC <sub>50</sub>	FP-3 IC <sub>50</sub>
E-1 	79,8	n. b.	n. b.
E-2 	124,9	80	n. b.
E-3 	66,4	80	n. b.
E-4 	142,3	k. l.	n. b.
E-5 	141,0	k. l.	n. b.
E-6 	16,9	n. b.	n. b.
E-7 	k. l.	n. b.	k. l.
E-8 	118,4	k. l.	n. b.

Die in Tab. 4.3 dargestellten halbmaximalen Hemmkonzentrationen lassen keine signifikanten Unterschiede zwischen Etacrynsäureestern und -amiden, bezüglich ihres

inhibitorischen Effekts, erkennen. So weisen die Strukturanaloga E-4 und E-5 nahezu identische  $IC_{50}$ -Konzentration gegenüber *P.-falciparum*-Blutstadien auf. Auffällig ist jedoch, dass das Etacrynsäureamid E-3, welches keine aktivierende Doppelbindung trägt, eine geringere halbmaximale Hemmkonzentration als sein Doppelbindung enthaltendes Strukturanalog E-2 gegenüber *P.-falciparum*-Blutstadien aufweist. Diese beiden Inhibitoren zeigen ebenfalls, wie bereits oben erwähnt, eine Hemmwirkung gegenüber rekombinanten FP-2. Die höhere antiplasmodiale Aktivität von E-3 könnte mit einer beobachteten besseren Löslichkeit in DMSO und einer damit verbunden erleichterten Aufnahme in die Zellen der Parasiten erklärbar sein. Eine ähnliche Beobachtung wurde für das acylierte Anisol E-6 gemacht, welches *in vitro* die geringste  $IC_{50}$ -Konzentration aufwies. Des Weiteren handelt es sich bei diesem Inhibitor um ein kleines Molekül, welches möglicherweise leichter die einzelnen Membranbarrieren überwindet, die zwischen dem umgebenden Medium und der Nahrungsvakuole des Parasiten, dem Lokalisationsort der Falcipaine, liegen. Bis heute sind die Transportmechanismen sowie die –wege, über die ein Wirkstoff in die Nahrungsvakuole des Parasiten gelangt, noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde jedoch berichtet, dass kleinere organische Moleküle und Nährstoffe vom Parasiten aufgenommen werden, ohne dass sie das Wirtszellzytosol passieren müssen (Kirk, 2001; Saliba und Kirk, 2001; Abb. 4.5).

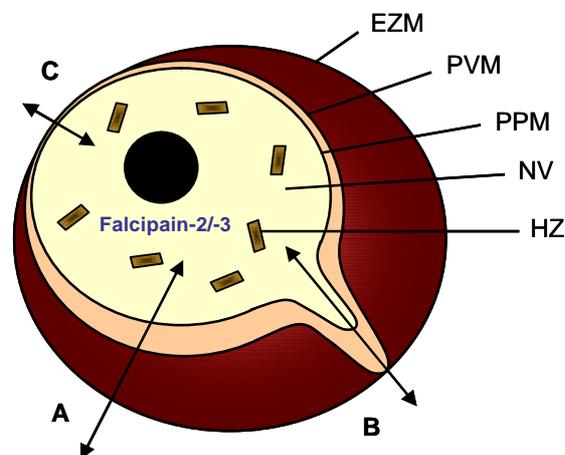


Abb. 4.5. Schematische Darstellung der vermuteten Transportwege zwischen extrazellulärem Medium und dem intraerythrozytären Parasiten. A. Klassischer Transportweg über die Erythrozytenmembran (EZM), die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) und die Parasitenplasmamembran (PPM). B und C. Alternative Wege, welche den Transport zwischen Medium und Nahrungsvakuole (NV) ermöglichen, ohne das Zytosol des Erythrozyten zu passieren. In der Nahrungsvakuole sind die Cysteinproteasen Falcipain-2 und Falcipain-3 lokalisiert, die an der Hydrolyse des Hämoglobins beteiligt sind. Das für den Parasiten toxische Abbauprodukt des roten Blutfarbstoffes, das Häm, wird vom dem Erreger zu atoxischen Hämозoin (HZ) umgewandelt.

Das Derivat E-6, das nur eine Etacrynsäurepartialstruktur besitzt, könnte daher im Hinblick auf eine weitergehende Entwicklung nichtpeptidischer Cysteinprotease-Inhibitoren als Leitstruktur dienen. Hierbei könnte eine eingehende Untersuchung einer hemmenden Wirkung auf rekombinant exprimierte Falcipaine und andere Cysteinproteasen näheren Aufschluss über sein inhibitorisches Potential bzw. seine selektive Aktivität gegenüber den Falcipainen von *P. falciparum* geben.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Etacrynsäurederivate waren Teil einer umfassenden Studie zur Evaluierung der Struktur-Wirkungsbeziehungen einer Vielzahl synthetisierter nichtpeptidischer Inhibitoren auf Basis der Etacrynsäure (Dude *et al.*, 2008). In dieser Studie konnte für ein Olefinderivat der Etacrynsäure eine besonders gute inhibitorische Wirkung sowohl auf rekombinant exprimiertes FP-2 ( $IC_{50} = 3,0 \mu\text{M}$ ) und FP-3 ( $IC_{50} = 11,9 \mu\text{M}$ ) als auch auf *P.-falciparum*-Blutstadien des chloroquinresistenten Stammes W2 ( $IC_{50} = 9,0 \mu\text{M}$ ) festgestellt werden. Aufgrund des viel versprechenden Potentials dieses Inhibitors wurde er zur weiter gehenden Analyse biotinyliert (Dude *et al.*, 2008; Abb. 4.6).

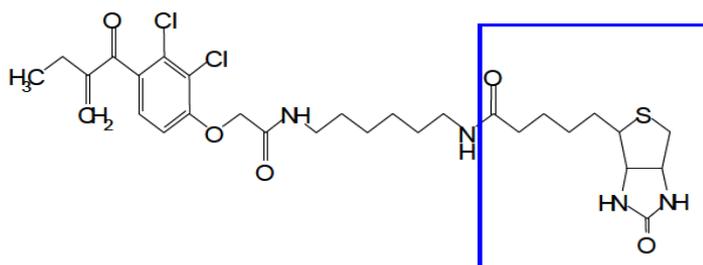


Abb. 4.6. Strukturformel des biotinylierten, nichtpeptidischen Cysteinproteaseinhibitors auf Basis von Etacrynsäure. Der blaue Kasten kennzeichnet die Biotinmarkierung. Quelle: Dr. rer. nat. C. Gelhaus, verändert.

Mit Hilfe der Biotinmarkierung lässt sich dieser Inhibitor über Streptavidin-Konjugate nachweisen und die Bindungseigenschaften bzw. der Bindungsort und die Zielmoleküle können eingehender untersucht werden (Gelhaus *et al.*, 2004; Vicik *et al.*, 2006). Zusammenfassend weisen sowohl die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten peptidomimetischen als auch die nichtpeptidischen Inhibitoren ein Potential zur Hemmung der enzymatischen Aktivität von Cysteinproteasen auf. Die hier diskutierten Daten sind somit eine wichtige Grundlage für weiterführende Analysen und zur Entwicklung effektiverer peptidischer und nichtpeptidischer Cysteinproteaseinhibitoren.

## 5 Ausblick

In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurde eine Vielzahl sexualstadienspezifischer Proteine identifiziert, welche für die Entwicklung der Sexualstadien und die Transmission von *P. falciparum* von Bedeutung sind. Auch die aus den sechs Proteinen PfCCp1 bis PfCCp5 und PfFNPA bestehende Multiadhäsionsdomänenfamilie wird in der Sexualphase des Parasiten exprimiert. Für PfCCp1, PfCCp2 und PfCCp3 konnte gezeigt werden, dass sie eine essentielle Funktion während der Entwicklungsprozesse in der Mücke haben. Sie besitzen daher ein viel versprechendes Potential als Komponenten für TBV. Erste Versuche zeigten bereits, dass PfCCp-Antisera in Anwesenheit von aktivem Serum *in vitro* die Exflagellation teilweise inhibieren. Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken mit PfCCp-Antisera sollen nun klären, ob PfCCp-Antikörper bei Anwesenheit des Komplementsystems *in vivo* die Transmission von *P. falciparum* blockieren. Des Weiteren könnten Mückenfütterungsversuche unter Verwendung von PfCCp2- und PfCCp3-KO-Parasiten und gleichzeitiger Gabe des entsprechenden rekombinanten Proteins Aufschluss darüber geben, ob damit die Transmission dieser PfCCp2- und PfCCp3-defizienten Gametozyten auf *Anopheles*-Mücken wiederhergestellt werden kann. Kürzlich ist es der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. J. Templeton am WMC (New York) gelungen mittels *double-crossover*-Rekombination PfCCp1-KO-Parasiten herzustellen, die gegenwärtig in unserem Labor nach Membranfütterungen von *Anopheles*-Mücken auf ihren Phänotyp hin analysiert werden. Aktuelle Untersuchungen sollen ferner eine mögliche Reexpression der PfCCp-Proteine in den Mückenstadien klären.

RT-PCR- sowie Western-Blot-Analysen unter Verwendung von Gametozyten des Stadium I sollten durchgeführt werden, um festzustellen, ob eine Expression der PfCCp5- und PfFNPA-Proteine in diesen frühen Sexualstadien vorhanden ist. Im Hinblick auf die Identifizierung weiterer Interaktionspartner dieser beiden PfCCp-Proteine sollten weitere Ko-Immunopräzipitationen und Affinitätschromatographiestudien unter Verwendung anderer, bekannter sexualstadienspezifischer Proteine von *P. falciparum* durchgeführt werden. Im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung von PfCCp5 bei der Modifikation der parasitophoren Vakuole im Verlauf der Gametozytogenese wäre hierbei insbesondere die Untersuchung einer Interaktion von PfCCp5 mit Pfg14.748 höchst interessant. Des Weiteren steht die Analyse der PfCCp5- und PfFNPA-comp-Parasiten mittels eines spezifisch gegen den HA-Tag gerichteten Antikörpers noch aus, um die mittels diagnostischer PCR erhaltene Integration der entsprechenden Konstrukte zu bestätigen.

Nach Ausklonierung konnte bereits eine stabile Integration des *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukts in den WT-Locus von *PfFNPA* mittels Southern-Blot bestätigt werden. In Gametozyten des *PfFNPA*-KO-Stammes war nachfolgend dann eine fehlende Expression des *PfFNPA*-Proteins feststellbar. Ein potentiell verzögerter Phänotyp der *PfFNPA*-KO-Mutanten wird derzeit anhand von Mückenfütterungsversuchen analysiert, um die mögliche Funktion dieses Proteins genauer bestimmen zu können. Mittels Ko-Expressionsstudien konnte kürzlich bereits eine verminderte Expression aller übrigen *PfCCp*-Mitglieder in *PfFNPA*-KO-Parasiten gezeigt werden. Ko-Immunopräzipitationen unter Verwendung von Gametozyten der *PfFNPA*-KO-Mutanten könnten nun weiterhin aufdecken, ob in diesen Parasiten die *PfCCp*-Proteine noch miteinander und mit den anderen Proteinen der parasitophoren Vakuole interagieren können. Exflagellationsinhibitionsassays, mittels Antiseren gerichtet gegen *PfFNPA* und gegen andere *PfCCp*-Proteine, unter Verwendung von *PfFNPA*-KO-Kulturen, könnten die mutmaßliche Involvierung von *PfFNPA* bei der Befruchtung näher beleuchten.

Aktuell wird in unserer Arbeitsgruppe versucht, den *PfCCp3*-Promotor in einen Expressionsvektor zu klonieren, um mit diesem Konstrukt anschließend Rescue-Experimente an *PfCCp3*-KO-Parasiten durchführen zu können. Mit diesem Versuch soll herausgefunden werden, ob durch die exogene Expression von *PfCCp3* die anderen *PfCCp*-Proteine wieder korrekt exprimiert werden. Die in vorliegender Arbeit und in unserem Labor durchgeführten Interaktionsstudien stützen die Hypothese der Proteinkomplexbildung von sexualstadienspezifischen Adhäsionsproteinen während der Gamogonie. Zur Identifikation weiterer potentieller Interaktionspartner der *PfCCp*-Familie und einer möglichen Bindung von Komplementfaktoren an die *PfCCp*-Proteine werden derzeit Ko-Immunopräzipitation bzw. Ko-Expressionsstudien sowie Affinitätschromatographien durchgeführt. Ebenso könnten MALDI-TOF-Analysen zur antikörperunabhängigen Auffindung von *PfCCp*-Interaktionspartnern beitragen. Affinitätschromatographiestudien unter Verwendung einzelner rekombinanter Domänen und *yeast-two-hybrid*-Analysen könnten direkte Protein-Protein Interaktionen einzelner *PfCCp*-Motive aufklären.

Wie Zelladhäsionsstudien zeigten, binden die *PfCCp*-Proteine an Makrogameten. Damit könnte möglicherweise eine Signalkaskade im Parasiten ausgelöst werden. Da ein Kalziumanstieg ein Indikator für die Induktion einer Signalkaskade ist, wäre die Messung des intrazellulären Kalziumspiegels von WT- bzw. *PfCCp*-KO-Makrogameten nach der Bindung rekombinanter Proteine eine Methode, um diese Theorie zu untermauern. Ferner sollte überprüft werden, ob die *PfCCp*-Proteine während der Gametogenese prozessiert werden. Nach Identifizierung der Spaltstellen dieser Proteine könnten anschließend Zelladhäsionsstudien an Makrogameten mittels

rekombinanter *PfCCp*-Proteine, welche den Prozessierungsprodukten während der Gametogenese entsprechen, zur Klärung eines erhöhten Bindungsverhaltens der Spaltprodukte durchgeführt werden.

Cysteinproteasen sind attraktive Angriffsziele für die Entwicklung neuer, effektiverer Antimalariamedikamente. Die in der vorliegenden Arbeit auf ihre antiplasmodiale Aktivität untersuchten peptidomimetischen und nichtpeptidischen Inhibitoren könnten als Leitstrukturen für die Synthese von Substanzen mit einem 1,4-Benzodiazepin- bzw. Etacrynsäure-Grundgerüst, welche spezifisch die plasmodialen Cysteinproteasen FP-2 und FP-3 hemmen, dienen. Hierbei könnten eingehende Dockingstudien anhand hypothetischer Verbindungen auf Basis von 1,4-Benzodiazepin und Etacrynsäure erste Hinweise auf relevante Wechselwirkungen zwischen dem potentiellen Inhibitor und dem Enzym geben. Ein Screening der neu synthetisierten Verbindungen auf ihre inhibitorische Aktivität gegen Cysteinproteasen mittels HPLC-Assays, bei denen die Menge der zeitabhängigen Umsetzung des Substrats Informationen über die Enzymaktivität liefert, wäre ein weiterer Schritt die Effektivität dieser 1,4-Benzodiazepin- und Etacrynsäurederivate zu überprüfen. Für die Analyse des Bindungsortes eines viel versprechenden Inhibitors von FP-2 bzw. FP-3, müsste dieser an rekombinant exprimiertes FP-2 oder FP-3 gebunden werden und nach tryptischer Spaltung massenspektrometrisch untersucht werden. Durch Vergleich der Unterschiede in den Spektren der Messungen, anhand der errechneten Daten einer *in-silico*-Spaltung für die Massen der theoretischen Peptide, könnten Aufschlüsse über den Bindungsort gewonnen werden. Inhibitoren, welche sowohl eine gute Hemmwirkung gegenüber rekombinant exprimierten Falcipainen besitzen als auch eine geringe halbmaximale Hemmkonzentration unter Verwendung von *P. falciparum*-Blutkulturen aufweisen, sollten in einem nachfolgenden Zytotoxizitätstest an humanen Zellen *in vitro* hinsichtlich ihrer toxischen Nebenwirkungen überprüft werden. Viel versprechende Verbindungen könnten darüber hinaus fluoreszenz- bzw. biotinmarkiert werden, um somit genauere Erkenntnisse über die intrazelluläre Lokalisation, die Zielmoleküle und mögliche Transportmechanismen in die Zelle zu gewinnen. Abschließende Experimente im Mausmodell *in vivo* an *P. berghei* würden dann die Anwendbarkeit sowie die Verträglichkeit des Inhibitors im lebenden Organismus beleuchten, um eine Eignung für den Einsatz in klinischen Studien am Menschen zu evaluieren.

## 6 Zusammenfassung

Der Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum*, ist für eine jährliche Todesrate von über einer Million Menschen verantwortlich. Rasch zunehmende Erregerresistenzen gegen gängige Antimalariamedikamente und das Fehlen eines Impfstoffes machen die Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen und Medikamenten unerlässlich. Sexualstadienspezifische Oberflächenproteine des Parasiten sind attraktive Zielstrukturen für die Entwicklung von TBV, welche eine Entwicklung von *P. falciparum* in der Mücke unterbrechen. Die Suche nach multiplentier- oder bakterienähnlichen, extrazellulären Adhäsionsdomänen im Genom von *P. falciparum* führte zur Identifizierung einer Familie von sechs Proteinen mit hochkonservierten Adhäsionsmodulen, die vermutlich an Parasit-Parasit- oder Parasit-Wirtsinteraktionen beteiligt sind, was sie zu potentiellen Kandidaten für Komponenten von TBV macht. Aufgrund ihrer gemeinsamen LCCL-Domäne wurden diese Proteine *PfCCp1* bis *PfCCp5* sowie *PfFNPA* benannt. *PfFNPA* besitzt keine LCCL-Domäne, es ist jedoch ähnlich aufgebaut wie *PfCCp5* und wurde daher mit in die *PfCCp*-Familie integriert. Die in der parasitophoren Vakuole reifer Gametozyten lokalisierenden *PfCCp1*- bis *PfCCp3*-Proteine werden während der Gametogenese teilweise freigesetzt und umgeben matrixähnlich entstehende Exflagellationszentren. In *PfCCp2*- und *PfCCp3*-defizienten Parasiten ist die Wanderung der Sporozoiten aus den Mitteldarmoozysten in die Speicheldrüsen der Mücke blockiert. Sexualstadienspezifische Expression und eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des Erregers in der Mücke sind die Hauptkriterien für potentielle TBV-Kandidaten.

Diese viel versprechenden Daten waren Anlass, in der vorliegenden Arbeit, die bisher nur hypothetischen *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine genauer zu untersuchen. Expressionsstudien von *PfCCp5* und *PfFNPA* mittels RT-PCR, Western-Blot-, Immunfluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopischen-Analysen zeigten, dass sie sowohl plasmamembranassoziiert in der parasitophoren Vakuole als auch intrazellulär in reifen Gametozyten exprimiert werden. Beide Proteine sind in Gametozyten ab dem Stadium II detektierbar und weisen in unreifen Gametozyten ein punktiertes Expressionsmuster auf. In reifen Gametozyten konzentriert sich ihre Expression dagegen v. a. auf die Zellpole. Ferner werden *PfCCp5* und *PfFNPA* auf der Oberfläche von Makrogameten, jedoch nicht in Mikrogameten und Ookineten exprimiert. Zusätzlich wird *PfCCp5* in einem Teil reifer Schizonten eines gametozytenbildenden Parasiten-Stammes exprimiert. Durch Integration eines Komplementations-Konstrukts in die 3'-untranslatierte Region von *PfCCp5* bzw. *PfFNPA* konnte gezeigt werden, dass beide Gene genetisch manipulierbar sind. Mit *PfCCp5*- bzw. *PfFNPA*-

KO-Konstrukten transfizierte WT-Parasiten wachsen nach erfolgter positiver Selektion jedoch nicht mehr. Diese Daten lassen vermuten, dass *PfCCp5* und *PfFNPA* eine essentielle Funktion in den Blutstadien bzw. bei Gametozytenbildung haben. Zur weiteren Analyse von *PfFNPA* wurde ein verkürztes Protein durch Integration eines weiteren *PfFNPA*-KO-Konstrukts in den Locus von WT-Parasiten generiert. Erste Analysen des *PfFNPA*-KO-Phänotyps deuten darauf hin, dass durch die Ausschaltung der 3'-Region des Gens das Protein nicht mehr korrekt exprimiert wird, obwohl keine morphologischen Veränderungen der Blutstadien des Parasiten feststellbar sind. Außerdem werden *PfCCp5* und *PfFNPA* ko-abhängig in *PfCCp1*-, *PfCCp2*- und *PfCCp3*-KO-Gametozyten exprimiert. Ko-Immünpräzipitationsstudien zeigten, dass beide Proteine mit den anderen *PfCCp*-Mitgliedern interagieren. Affinitätschromatographiestudien deckten dann direkte Interaktionen einzelner *PfCCp*-Domänen auf. Hierbei sind v. a. die LCCL-, die SR- und die NEC- Domäne an Proteininteraktionen beteiligt, was die Hypothese einer Komplexbildung der *PfCCp*-Familie während der Gametogenese des Erregers stützt. Transmissionsblockierungsstudien sollen nun die Eignung ausgewählter *PfCCp*-Proteine als TBV-Komponenten näher beleuchten.

Zunehmende Resistenzen gegen gebräuchliche Malariamedikamente veranlassen zur Suche nach neuen Angriffspunkten zur Behandlung der Erkrankung. Die maßgeblich an der Hämoglobinhydrolyse beteiligten plasmodialen Cysteinproteasen Falcipain-2 und Falcipain-3 sind mögliche Ziele für die Entwicklung neuer Antimalariawirkstoffe. In der vorliegenden Arbeit wurden peptidomimetische 1,4-Benzodiazepin- und nicht-peptidische Etacrynsäurederivate *in vitro* auf ihre antiplasmodiale Wirkung an *P.-falciparum*-Blutstadien getestet. Ein erstes Screening hatte gezeigt, dass die eine Vinylsulfonkopfgruppe tragenden 1,4-Benzodiazepinderivate rekombinant exprimiertes Falcipain-2 irreversibel hemmen. *In vitro* konnte dann auch eine antiplasmodiale Aktivität für diese Verbindungen festgestellt werden. Dockingstudien und HPLC-Assays mit den Etacrynsäurederivaten deckten eine Hemmung der Cysteinprotease Papain und der SARS-M<sup>pro</sup>-Hauptprotease der Coronaviren auf. Weiterhin konnte in einem Screening an rekombinant exprimiertem Falcipain-2 und Falcipain-3 eine inhibitorische Wirkung für einen Teil dieser Etacrynsäurederivate festgestellt werden. Der *In-vitro*-Test an *P.-falciparum*-Blutstadien deckte dann eine schwache antiplasmodiale Aktivität von fluorsubstituierten Etacrynsäurederivaten und von Derivaten mit einer modifizierten Etacrynsäurepartialstruktur auf. Der viel versprechendste Inhibitor dieser Studie wurde nun zur Identifizierung potentieller Bindungspartner mittels Affinitätsbindungsstudien biotyniliert. Zusammenfassend besitzen beide getesteten Wirkstoffklassen eine inhibierende Aktivität gegenüber Cysteinproteasen womit sie die Grundlage für die Entwicklung neuer, effektiverer plasmodialer Cysteinproteaseinhibitoren bieten.

## 7 Summary

The causative agent of Malaria tropica, *Plasmodium falciparum*, is responsible for more than 1 million deaths each year. The intensive search for new therapeutic strategies and drugs remains essential because of a rapidly increasing resistance of the pathogen against common available drugs and the persistent lack of a malaria vaccine. Sexual stage-specific surface proteins of the parasite are attractive targets for the development of transmission blocking vaccines (TBV), which are able to block the development of *P. falciparum* within the mosquito. The screening of the *P. falciparum* genome for multiple animal- or bacterial-like, extracellular adhesion domains identified a protein family with highly conserved adhesive modules consisting of six members. They are supposed to be involved in parasite-parasite or parasite-host interactions making them promising candidates for subunits of TBV. Due to a shared LCCL-domain these proteins were named *PfCCp1* through *PfCCp5* and *PfFNPA*. *PfFNPA* lacks this LCCL-domain but because of its similarity to *PfCCp5* it was integrated into the *PfCCp* family. The three family members *PfCCp1*, *PfCCp2* and *PfCCp3* localize within the parasitophorous vacuole of mature gametocytes and are partly released during gamete emergence surrounding exflagellation centers extracellularly in a matrix-like pattern. Functional disruption of *PfCCp2* and *PfCCp3* leads to a blockade of transition of sporozoites from the midgut oocysts to the salivary glands within the mosquito. Sexual stage-specific expression and an essential role for the parasite development within the mosquito are two major criteria for prospective components of TBV.

These promising data gave reason for a detailed analysis of the so far only hypothetical *PfCCp5* and *PfFNPA* proteins in the present work. Expression analysis of *PfCCp5* and *PfFNPA* using RT-PCR, Western Blot, immunofluorescence assays and transmission electronmicroscopy revealed that they are intracellularly expressed as well as in association with the plasma membrane within the parasitophorous vacuole of mature gametocytes. Expression of both proteins is detectable in stage II gametocytes. They exhibit a punctuated expression pattern in immature gametocytes, but in mature gametocytes proteins are more restricted to the poles. *PfCCp5* as well as *PfFNPA* are present on the surface of macrogametes but not in microgametes and their expression ceases during ookinete maturation. Additionally *PfCCp5* is also expressed in a subset of schizonts of a gametocyte forming parasite strain. Through integration of a *PfCCp5*- and a *PfFNPA*-complementation construct it was possible to show that the genes are accessible for genetic manipulation. In contrast parasites transfected with either a *PfCCp5*- or a *PfFNPA*-KO-construct do not grow after positive selection. These data support the assumption that both proteins are essential for the parasite blood stages or

for the development of gametocytes. For further characterization of *PfFNPA* a truncated protein was synthesized by integration of another *PfFNPA*-KO-construct into the WT-locus of the gene. First studies of the *PfFNPA*-KO phenotype revealed that disruption of the 3'-region of the gene results in an incorrect protein expression although the parasites blood stages do not exhibit morphological changes. Additionally *PfCCp5* and *PfFNPA* are co-dependently expressed in *PfCCp1*-, *PfCCp2*- and *PfCCp3*-KO parasites. Co-immunoprecipitation studies showed interactions of these two proteins with the other *PfCCp* family members. Affinitychromatography studies on recombinantly expressed *PfCCp* proteins further demonstrated direct interactions of distinct *PfCCp*-domains. Especially the LCCL-, the SR- and the NEC-domain are involved in protein interactions within the *PfCCp* family supporting the hypothesis that protein complex formation during gametogenesis of the pathogen is mediated by the *PfCCp* family members. Transmission blocking assays will now elucidate the potential of select *PfCCp* proteins as subunits of TBV.

Rising resistances against common available antimalaria drugs prompt the search for new targets for the treatment of the disease. Falcipain-2 and falcipain-3 are cysteine proteases of *Plasmodium* which play a pivotal role in hemoglobin hydrolysis and are putative targets for the development of new antimalarial drugs. In the present work a set of peptidomimetic 1,4-benzodiazepin derivatives and a set of non-peptidic etacrynic acid derivatives were evaluated for their antiplasmodial activity. Initial screening of the 1,4-benzodiazepin derivatives containing a vinyl sulfone warhead on recombinantly expressed falcipain-2 revealed irreversible inhibition of the enzyme. These compounds also exhibited antiplasmodial activity *in vitro*. Docking studies and HPLC-Assays using the etacrynic acid derivatives revealed inhibition of the cysteine protease papain and of the SARS coronavirus main protease M<sup>Pro</sup>. Further screening on recombinantly expressed falcipain-2 and falcipain-3 revealed inhibitory effects for some of these derivatives. *In vitro* testing on *P. falciparum* blood stages revealed weak antiplasmodial activity for flourine substituted etacrynic acid derivatives and for derivatives having a partially modified structure of etacrynic acid. The most promising inhibitor of the study has now been biotinylated for further affinity binding studies to evaluate its potential binding partners. Taken together both tested inhibitor classes exhibit inhibiting activity against cysteine proteases and therefore provide basis for the development of more effective new cysteine protease inhibitors.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abdin, M. Z., Israr, M., Rehman, R. U. und Jain, S. K.** (2003). Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Med* **69**, 289-99.
- Aide, P., Bassat, Q. und Alonso, P. L.** (2007). Towards an effective malaria vaccine. *Arch Dis Child* **92**, 476-479.
- Alano, P.** (2007). Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol* **66**, 291-302.
- Alano, P. und Billker, O.** (2005). Gametocytes and gametes. In: Sherman, I. W. (Ed.), Molecular approaches to malaria. *ASM Press*, Washington S. 191-219.
- Alano, P., Premawansa, S., Bruce, M. C. und Carter, R.** (1991). A stage specific gene expressed at the onset of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **46**, 81-88.
- Alano, P., Read, D., Bruce, M., Aikawa, M., Kaido, T., Tegoshi, T., Bhatti, S., Smith, D. K., Luo, C., Hansra, S. et al.** (1995). COS cell expression cloning of Pfg377, a Plasmodium falciparum gametocyte antigen associated with osmiophilic bodies. *Mol Biochem Parasitol* **74**, 143-156.
- Alonso, P. L., Sacarlal, J., Aponte, J. J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., Mandomando, I., Spiessens, B., Guinovart, C., Espasa, M. et al.** (2004). Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* **364**, 1411-1420.
- Aponte J. J., Aide P., Renom M., Mandomando I., Bassat Q., Sacarlal J., Manaca M. N., Lafuente S., Barbosa A., Leach A. et al.** (2007). Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. *Lancet* **370**, 1543-51.
- Arai, M., Billker, O., Morris, H. R., Panico, M., Delcroix, M., Dixon, D., Ley, S. V. und Sinden, R. E.** (2001). Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of Plasmodium in the midgut of the mosquito. *Mol Biochem Parasitol* **116**, 17-24.
- Arakawa, T., Komesu, A., Otsuki, H., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R., Matsumoto, Y., Tsuji, N., Wu, Y., Torii, M. und Tsuboi, T.** (2005). Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of Plasmodium falciparum. *Infect Immun* **73**, 7375-7380.
- Aruffo, A., Bowen, M. A., Patel, D. D., Haynes, B. F., Starling, G. C., Gebe, J. A. und Bajorath, J.** (1997). CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* **18**, 498-504.

- Bailly, E., Jambou, R., Savel, J. und Jaurequiberry, G.** (1992). Plasmodium falciparum: differential sensitivity in vitro to E-64 (cysteine protease inhibitor) and Pepstatin A (aspartyl protease inhibitor). *J Protozool* **39**, 593-599.
- Baker, D. A., Daramola, O., McCrossan, M. V., Harmer, J. und Targett, G. A.** (1994). Subcellular localization of Pfs16, a Plasmodium falciparum gametocyte antigen. *Parasitology* **108 (Bd. 2)**, 129-137.
- Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S. und Mitchell, G. H.** (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitol Today* **16**, 427-433.
- Barnes, D. A., Thompson, J., Triglia, T., Day, K. und Kemp, D. J.** (1994). Mapping the genetic locus implicated in cytoadherence of Plasmodium falciparum to melanoma cells. *Mol Biochem Parasitol* **66**, 21-29.
- Barrett, A. J. und Rawlings, N. D.** (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem* **382**, 727-733.
- Bateman, A. und Sandford, R.** (1999). The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr Biol* **9**, R588-590.
- Baumgartner, S., Hofmann, K., Chiquet-Ehrismann, R. und Bucher, P.** (1998). The discoidin domain family revisited: new members from prokaryotes and a homology-based fold prediction. *Protein Sci* **7**, 1626-1631.
- Beard, C. B., Benedict, M. Q., Primus, J. P., Finnerty, V. und Collins, F. H.** (1995). Eye pigments in wild-type and eye-color mutant strains of the African malaria vector Anopheles gambiae. *J Hered* **86**, 375-380.
- Berg, J. M., Tymozko, J. L. und Stryer, L.** (2003). Biochemie; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Bharadwaj, D., Mold, C., Markham, E. und Du Clos, T. W.** (2001). Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* **166**, 6735-6741.
- Billingsley, P. F, Foy, B. und Rasgon, J. L.** (2008). Mosquitocidal vaccines: a neglected addition to malaria and dengue control strategies. *Trends Parasitol*, Epub.
- Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G. und Sinden, R. E.** (1997). The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei in vitro. *Parasitology* **115 (Bd. 1)**, 1-7.
- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R. E. und Morris, H. R.** (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**, 289-292.

- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B. und Brinkmann, V.** (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* **117**, 503-514.
- Birnboim, H. C. und Doly, J.** (1977). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Blumbach, B., Pancer, Z., Diehl-Seifert, B., Steffen, R., Munkner, J., Muller, I. und Muller, W. E.** (1998). The putative sponge aggregation receptor. Isolation and characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats. *J Cell Sci* **111 (Bd. 17)**, 2635-2644.
- Bohle, D. S., Dinnebier, R. E., Madsen, S. K. und Stephens, P. W.** (1997). Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. *J Biol Chem* **272**, 713-716.
- Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J. und De Risi, J. L.** (2003). The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* **1**, 85-100.
- Brooks, S. R. und Williamson, K. C.** (2000). Proteolysis of *Plasmodium falciparum* surface antigen, Pfs230, during gametogenesis. *Mol Biochem Parasitol* **106**, 77-82.
- Bruce, M. C., Alano, P., Duthie, S. und Carter, R.** (1990). Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* **100 (Bd. 2)**, 191-200.
- Bruce, M. C., Carter, R. N., Nakamura, K., Aikawa, M. und Carter, R.** (1994). Cellular location and temporal expression of the *Plasmodium falciparum* sexual stage antigen Pfs16. *Mol Biochem Parasitol* **65**, 11-22.
- Bustamante, P. J., Woodruff, D. C., Oh, J., Keister, D. B., Muratova, O. und Williamson, K. C.** (2000). Differential ability of specific regions of *Plasmodium falciparum* sexual-stage antigen, Pfs230, to induce malaria transmission-blocking immunity. *Parasite Immunol* **22**, 373-380.
- Carlton, J. M., Angiuoli, S. V., Suh, B. B., Kooij, T. W., Perteza, M., Silva, J. C., Ermolaeva, M. D., Allen, J. E., Selengut, J. D., Koo, H. L. et al.** (2002). Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* **419**, 512-519.
- Carlton, J. M., Silva, J. C. und Hall, N.** (2005). The genome of model malaria parasites, and comparative genomics. *Curr Issues Mol Biol* **7**, 23-37.
- Carter, R. und Graves, P. M.** (1988). Malaria parasites of man: life cycles and morphology in: Wernsdorfer, W. H., McGregeor, I. (Eds.), *Malaria – Principles and Practise of Malariology*, Churchill Livingstone, S. 273-305.
- Carter, R.** (2001). Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* **19**, 2309-2314.

- Carter, R., Graves, P. M., Creasey, A., Byrne, K., Read, D., Alano, P. und Fenton, B.** (1989). Plasmodium falciparum: an abundant stage-specific protein expressed during early gametocyte development. *Exp Parasitol* **69**, 140-149.
- Carter, R., Mendis, K. N., Miller, L. H., Molineaux, L. und Saul, A.** (2000). Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med* **6**, 241-244.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Dondorp, A., Williams, T., Angus, B., Simpson, J. A., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S., Newbold, C. I. und White, N. J.** (2000). The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* **182**, 629-633.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., McGready, R., Proux, S., Newton, P., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S. und White, N. J.** (2002). Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *J Infect Dis* **185**, 1538-1541.
- Claudianos, C., Dessens, J. T., Trueman, H. E., Arai, M., Mendoza, J., Butcher, G. A., Crompton, T. und Sinden, R. E.** (2002). A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development. *Mol Microbiol* **45**, 1473-1484.
- Collins, W. E., Anders, R. F., Ruebush, T. K., 2nd, Kemp, D. J., Woodrow, G. C., Campbell, G. H., Brown, G. V., Irving, D. O., Goss, N., Filipinski, V. K. et al.** (1991). Immunization of owl monkeys with the ring-infected erythrocyte surface antigen of Plasmodium falciparum. *Am J Trop Med Hyg* **44**, 34-41.
- Colombatti, A. und Bonaldo, P.** (1991). The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* **77**, 2305-2315.
- Colombatti, A., Bonaldo, P. und Doliana, R.** (1993). Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix* **13**, 297-306.
- Cooke, B. M., Lingelbach, K., Bannister, L. H. und Tilley, L.** (2004). Protein trafficking in Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Trends Parasitol* **20**, 581-9.
- Coombs, G. H., Goldberg, D. E., Klemba, M., Berry, C., Kay, J. und Mottram, J. C.** (2001) Aspartic proteases of Plasmodium falciparum and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol*, **17** 532-7.
- Cowman, A. F. und Crabb, B. S.** (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**, 755-766.
- Culvenor, J. G., Day, K. P. und Anders, R. F.** (1991). Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infect Immun* **59**, 1183-1187.
- Dahl, E. L. und Rosenthal, P. J.** (2008). Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. *Trends Parasitol* **24**, 279-84.

- Dahl, E. L. und Rosenthal, P. J.** (2005). Biosynthesis, localization, and processing of falcipain cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **139**, 205-12.
- Day, K. P., Karamalis, F., Thompson, J., Barnes, D. A., Peterson, C., Brown, H., Brown, G. V. und Kemp, D. J.** (1993). Genes necessary for expression of a virulence determinant and for transmission of *Plasmodium falciparum* are located on a 0.3-megabase region of chromosome 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8292-8296.
- Deitsch, K., Driskill, C. und Wellems, T.** (2001). Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res* **29**, 850-3.
- Delrieu, I., Waller, C. C., Mota, M. M., Grainger, M., Langhorne, J. und Holder, A. A.** (2002). PSLAP, a protein with multiple adhesive motifs, is expressed in *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Mol Biochem Parasitol* **121**, 11-20.
- Dessens, J. T., Sinden, R. E. und Claudianos, C.** (2004). LCCL proteins of apicomplexan parasites. *Trends Parasitol* **20**, 102-108.
- Dessens, J. T., Beetsma, A. L., Dimopoulos, G., Wengelnik, K., Crisanti, A., Kafatos, F. C. und Sinden, R. E.** (1999). CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *EMBO J* **18**, 6221-6227.
- Dessens, J. T., Mendoza, J., Claudianos, C., Vinetz, J. M., Khater, E., Hassard, S., Ranawaka, G. R. und Sinden, R. E.** (2001). Knockout of the rodent malaria parasite chitinase pbCHT1 reduces infectivity to mosquitoes. *Infect Immun* **69**, 4041-4047.
- Dessens, J. T., Siden-Kiamos, I., Mendoza, J., Mahairaki, V., Khater, E., Vlachou, D., Xu, X. J., Kafatos, F. C., Louis, C., Dimopoulos, G. et al.** (2003). SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Mol Microbiol* **49**, 319-329.
- Dinglasan, R. R. und Jacobs-Lorena, M.** (2008). Flipping the paradigm on malaria transmission-blocking vaccines. *Trends Parasitol* **24**, 364-70.
- Dixon, M. W., Thompson, J., Gardiner, D. L. und Trenholme, K. R.** (2008). Sex in *Plasmodium*: a sign of commitment. *Trends Parasitol* **24**, 168-75.
- Dluzewski, A. R., Rangachari, K., Wilson, R. J. und Gratzer, W. B.** (1986). *Plasmodium falciparum*: protease inhibitors and inhibition of erythrocyte invasion. *Exp Parasitol* **62**, 416-422.
- Dorin, D., Alano, P., Boccaccio, I., Ciceron, L., Doerig, C., Sulpice, R. und Parzy, D.** (1999). An atypical mitogen-activated protein kinase (MAPK) homologue expressed in gametocytes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Identification of a MAPK signature. *J Biol Chem* **274**, 29912-29920.
- Dorin, D., Le Roch, K., Sallicandro, P., Alano, P., Parzy, D., Pouillet, P., Meijer, L. und Doerig, C.** (2001). Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite

Plasmodium falciparum Biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. *Eur J Biochem* **268**, 2600-2608.

**Dorin-Semlat, D., Quashie, N., Halbert, J., Sicard, A., Doerig, C., Peat, E., Ranford-Cartwright, L. und Doerig, C.** (2007). Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum by reverse genetics. *Mol Microbiol* **65**, 1170-80.

**Drew, M. E., Banerjee, R., Uffman, E. W., Gilbertson, S., Rosenthal, P. J. und Goldberg, D. E.** (2008). Plasmodium food vacuole plasmepsins are activated by falcipains. *J Biol Chem* **283**, 12870-6.

**Dua, M., Raphael, P., Sijwali, P. S., Rosenthal, P. J. und Hanspal, M.** (2001). Recombinant facipain-2 cleaves erythrocyte membrane ankyrin and protein 4.1. *Mol Biochem Parasitol* **116**, 95-99.

**Dude, M.-A., Kaeppler, U., Herb, M., Schiller, M., Schulz, F., Vedder, B., Heppner, S., Pradel, G., Gut, J., Rosenthal, P. J., Schirmeister, T., Leippe, M. und Gelhaus, C.** (2008). Synthesis and evaluation of non-peptidic cysteine protease inhibitors of *P. falciparum* derived from etacrynic acid. *Molecules* **4**, 19-35.

**Duffy, P. E. und Kaslow, D. C.** (1997). A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infect Immun* **65**, 1109-1113.

**Duraisingh, M. T., Triglia, T. und Cowman, A. F.** (2002). Negative selection of Plasmodium falciparum reveals targeted gene deletion by double crossover recombination. *Int J Parasitol* **32**, 81-89.

**Dyer, M. und Day, K. P.** (2003). Regulation of the rate of asexual growth and commitment to sexual development by diffusible factors from in vitro cultures of Plasmodium falciparum. *Am J Trop Med Hyg* **68**, 403-409.

**Ecker, A., Pinto, S. B., Baker, K. W., Kafatos, F. C. und Sinden, R. E.** (2007). Plasmodium berghei: plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in Anopheles stephensi. *Exp Parasitol* **116**, 504-508.

**Eksi, S. und Williamson, K. C.** (2002). Male-specific expression of the paralog of malaria transmission-blocking target antigen Pfs230, PfB0400w. *Mol Biochem Parasitol* **122**, 127-130.

**Eksi, S., Czesny, B., Greenbaum, D. C., Bogyo, M. und Williamson, K. C.** (2004). Targeted disruption of Plasmodium falciparum cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth. *Mol Microbiol* **53**, 243-250.

**Eksi, S., Haile, Y., Furuya, T., Ma, L., Su, X. und Williamson, K. C.** (2005) Identification of a subtelomeric gene family expressed during the asexual-sexual stage transition in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, **143**, 90-9.

- Eksi, S., Czesny, B., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Eling, W. und Williamson, K. C.** (2006). Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Mol Microbiol* **61**, 991-998.
- Eksi, S., Czesny, B., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Eling, W. und Williamson, K. C.** (2007). Inhibition of Plasmodium falciparum oocyst production by membrane-permeant cysteine protease inhibitor E64d. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1064-70.
- Elomaa, O., Sankala, M., Pikkarainen, T., Bergmann, U., Tuuttila, A., Raatikainen-Ahokas, A., Sariola, H. und Tryggvason, K.** (1998). Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *J Biol Chem* **273**, 4530-4538.
- Etlinger, H. M., Caspers, P., Matile, H., Schoenfeld, H. J., Stueber, D. und Takacs, B.** (1991). Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with Plasmodium falciparum. *Infect Immun* **59**, 3498-3503.
- Ettari, R., Nizi, E., Di Francesco, M. E., Micale, N., Grasso, S., Zappalà, M., Vicík, R. und Schirmeister, T.** (2008). Nonpeptidic vinyl and allyl phosphonates as falcipain-2 inhibitors. *Chem Med Chem* **3**, 1030-3.
- Ettari, R., Nizi, E., Di Francesco, M. E., Dude, M. A., Pradel, G., Vicík, R., Schirmeister, T., Micale, N., Grasso, S und Zappalà, M.** (2008). Development of peptidomimetics with a vinyl sulfone warhead as irreversible falcipain-2 inhibitors. *J Med Chem* **51**, 988-96.
- Fanning, S. L., Czesny, B., Sedegah, M., Carucci, D. J., van Gemert, G. J., Eling, W. und Williamson, K. C.** (2003). A glycosylphosphatidylinositol anchor signal sequence enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding Plasmodium falciparum sexual-stage antigen, Pfs230. *Vaccine* **21**, 3228-3235.
- Fidock, D. A., Rosenthal, P. J., Croft, S. L., Brun, R. und Nwaka, S.** (2004) Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 509-20.
- Fries, H. C., Lamers, M. B., van Deursen, J., Ponnudurai, T. und Meuwissen, J. H.** (1990). Biosynthesis of the 25-kDa protein in the macrogametes/zygotes of Plasmodium falciparum. *Exp Parasitol* **71**, 229-235.
- Fitch, C. D.** (2004). Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci*, **74**, 1957-72.
- Garcia, G. E., Wirtz, R. A., Barr, J. R., Woolfitt, A. und Rosenberg, R.** (1998). Xanthurenic acid induces gametogenesis in Plasmodium, the malaria parasite. *J Biol Chem* **273**, 12003-12005.
- Garcia, J. E., Puentes, A. und Patarroyo, M. E.** (2006). Developmental biology of sporozoite-host interactions in Plasmodium falciparum malaria: implications for vaccine design. *Clin Microbiol Rev*, **19**, 686-707.

- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S. et al.** (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498-511.
- Gelhaus, C., Vicik, R., Hilgenfeld, R., Schmidt, C. L., Leippe, M. und Schirmeister, T.** (2004) Synthesis and antiplasmodial activity of a cysteine protease-inhibiting biotinylated aziridine-2,3-dicarboxylate. *Biol Chem*, **385**, 435-438.
- Genton, B., Betuela, I., Felger, I., Al-Yaman, F., Anders, R. F., Saul, A., Rare, L., Baisor, M., Lorry, K., Brown, G. V. et al.** (2002). A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis* **185**, 820-827.
- Genton, B., Al-Yaman, F., Betuela, I., Anders, R. F., Saul, A., Baea, K., Mellombo, M., Taraika, J., Brown, G. V., Pye, D. et al.** (2003). Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. *Vaccine* **22**, 30-41.
- Gilbert, S. C., Plebanski, M., Gupta, S., Morris, J., Cox, M., Aidoo, M., Kwiatkowski, D., Greenwood, B. M., Whittle, H. C. und Hill, A. V.** (1998). Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. *Science* **279**, 1173-1177.
- Goldberger, G., Bruns, G. A., Rits, M., Edge, M. D. und Kwiatkowski, D. J.** (1987). Human complement factor I: analysis of cDNA-derived primary structure and assignment of its gene to chromosome 4. *J Biol Chem* **262**, 10065-10071.
- Gomez, M. S., Piper, R. C., Hunsaker, L. A., Royer, R. E., Deck, L. M., Makler, M. T. und Vander Jagt, D. L.** (1997). Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate dehydrogenase from the malarial parasite *P. falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **90**, 235-46.
- Goodman, C. D. und McFadden, G. I.** (2007). Fatty acid biosynthesis as a drug target in apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets* **8**, 15-30.
- Goodyer, I. D. und Taraschi, T. F.** (1997). *Plasmodium falciparum*: a simple, rapid method for detecting parasite clones in microtiter plates. *Exp Parasitol* **86**, 158-160.
- Greenwood, B. und Mutabingwa, T.** (2002). Malaria in 2002. *Nature* **415**, 670-672.
- Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H., Alonso, P. L., Collins, F. H. und Duffy, P. E.** (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest* **118**, 1266-76.
- Hall, N., Karras, M., Raine, J. D., Carlton, J. M., Kooij, T. W., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C. S., Pain, A., Christophides, G. K. et al.** (2005). A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* **307**, 82-86.
- Hanspal, M., Dua, M., Takakuwa, Y., Chishti, A.H. und Mizuno, A.** (2002) *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood* **100**, 1048-1054.

- Hayton, K. und Templeton, T. J.** (2008) Osmiophilic bodies and the odd organelles of alveolates. *Mol Microbiol* **67**, 236-40.
- Healer, J., McGuinness, D., Hopcroft, P., Haley, S., Carter, R. und Riley, E.** (1997). Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230. *Infect Immun* **65**, 3017-3023.
- Hempelmann, E.** (2007) Hemozoin biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. *Parasitol Res* **100**, 671-6.
- Heppner, D. G., Jr., Kester, K. E., Ockenhouse, C. F., Tornieporth, N., Ofori, O., Lyon, J. A., Stewart, V. A., Dubois, P., Lanar, D. E., Krzych, U. et al.** (2005). Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against *falciparum* malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* **23**, 2243-2250.
- Hisaeda, H., Saul, A., Reece, J. J., Kennedy, M. C., Long, C. A., Miller, L. H. und Stowers, A. W.** (2002). Merozoite surface protein 3 and protection against malaria in *Aotus nancymai* monkeys. *J Infect Dis* **185**, 657-664.
- Hodder, A. N., Crewther, P. E., Matthew, M. L., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. und Anders, R. F.** (1996). The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* **271**, 29446-29452.
- Hoffman, S. L., Goh, L. M., Luke, T. C., Schneider, I., Le, T. P., Doolan, D. L., Sacchi, J., de la Vega, P., Dowler, M., Paul, C. et al.** (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* **185**, 1155-1164.
- Hogg, T., Nagarajan, K., Herzberg, S., Chen, L., Shen, X., Jiang, H., Wecke, M., Blohmke, C., Hilgenfeld, R. und Schmidt, C. L.** (2006). Structural and functional characterization of Falcipain-2, a hemoglobinase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **281**, 25425-37.
- Hornebeck, W., Bellon, G. und Emonard, H.** (2005). Fibronectin type II (FnII)-like modules regulate gelatinase A activity. *Pathol Biol (Paris)* **53**, 405-410.
- Hu, J., Chen, Z., Gu, J., Wan, M., Shen, Q., Kieny, M. P., He J., Li Z., Zhang, Q., Reed, Z. et al.** (2008). Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, *Plasmodium falciparum* AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. *PLoS ONE* **3**, e1952.
- Ifediba, T. und Vanderberg, J. P.** (1981) Complete in vitro maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Nature* **294**, 364-366.
- Ishino, T., Orito, Y., Chinzei, Y. und Yuda, M.** (2006). A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. *Mol Microbiol* **59**, 1175-1184.

- Janse, C. J., van der Klooster, P. F., van der Kaay, H. J., van der Ploeg, M. und Overdulve, J. P.** (1986). DNA synthesis in *Plasmodium berghei* during asexual and sexual development. *Mol Biochem Parasitol* **20**, 173-182.
- Janse, C. J., Ponnudurai, T., Lensen, A. H., Meuwissen, J. H., Ramesar, J., Van der Ploeg, M. und Overdulve, J. P.** (1988). DNA synthesis in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* **96** (Bd. 1), 1-7.
- Jayaram, H. N., Cooney, D. A., Milman, H. A., Homan, E. R., King, W. M. und Cragoe, E. J.** (1975). Ethacrynic acid-an inhibitor of L-asparagine synthetase. *Biochem Pharmacol* **24**, 1787-92.
- Kadota, K., Ishino, T., Matsuyama, T., Chinzei, Y. und Yuda, M.** (2004). Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16310-16315.
- Kaeppler, U. und Schirmeister, T.** (2005). New non-peptidic inhibitors of papain derived from etacrynic acid. *Med Chem*, **1**, 361-70.
- Kaeppler, U., Stiefl, N., Schiller, M., Vicik, R., Breuning, A., Schmitz, W., Rupprecht, D., Schmuck, C., Baumann, K., Ziebuhr, J. und Schirmeister, T.** (2005). A new lead for nonpeptidic active-site-directed inhibitors of the severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease discovered by a combination of screening and docking methods. *J Med Chem* **48**, 6832-42.
- Kaplan, F., Ledoux, P., Kassamali, F. Q., Gagnon, S., Post, M., Koehler, D., Deimling, J. und Swezey, N. B.** (1999). A novel developmentally regulated gene in lung mesenchyme: homology to a tumor-derived trypsin inhibitor. *Am J Physiol* **276**, 1027-1036.
- Kariuki, M. M., Kiara, J. K., Mulaa, F. K., Mwangi, J. K., Wasunna, M. K. und Martin, S. K.** (1998). *Plasmodium falciparum*: purification of the various gametocyte developmental stages from in vitro-cultivated parasites. *Am J Trop Med Hyg* **59**, 505-508.
- Kaslow, D. C.** (1997). Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int J Parasitol* **27**, 183-189.
- Kaslow, D. C.** (2002). Transmission-blocking vaccines. *Chem Immunol* **80**, 287-307.
- Kaslow, D. C. und Shiloach, J.** (1994). Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission-blocking vaccine candidate: TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose. *Biotechnology (N Y)* **12**, 494-499.
- Kaslow, D. C., Quakyi, I. A., Syin, C., Raum, M. G., Keister, D. B., Coligan, J. E., McCutchan, T. F. und Miller, L. H.** (1988). A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**, 74-76.
- Kawamoto, F., Alejo-Blanco, R., Fleck, S. L., Kawamoto, Y. und Sinden, R. E.** (1990). Possible roles of Ca<sup>2+</sup> and cGMP as mediators of the exflagellation of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **42**, 101-108.

- Kawamoto, F., Fujioka, H., Murakami, R., Syafruddin, Hagiwara, M., Ishikawa, T. und Hidaka, H.** (1993). The roles of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- and cGMP-dependent pathways in gametogenesis of a rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *Eur J Cell Biol* **60**, 101-107.
- Keeley, A. und Soldati, D.** (2004) The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol* **14**, 528-32.
- Kennedy, P. E, Williams, F. L. und Abraham, D. J.** (1984). Design, synthesis, and testing of potential antisickling agents. 3. Ethacrynic acid. *J Med Chem* **27**, 103-5.
- Khan, S. M., Franke-Fayard, B., Mair, G. R., Lasonder, E., Janse, C. J., Mann, M. und Waters, A. P.** (2005). Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell* **121**, 675-687.
- Kirk, K.** (2001). Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* **81**, 495-537.
- Kjeldsen, L., Cowland, J. B., Johnsen, A. H. und Borregaard, N.** (1996). SGP28, a novel matrix glycoprotein in specific granules of human neutrophils with similarity to a human testis-specific gene product and a rodent sperm-coating glycoprotein. *FEBS Lett* **380**, 246-250.
- Köhler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D. und Roos, D. S.** (1997). A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* **275**, 1485–1488.
- Kobayashi, T., Sato, S., Takamiya, S., Komaki-Yasuda, K., Yano, K., Hirata, A., Onitsuka, I., Hata, M., Mi-ichi, F., Tanaka, T. et al.** (2007). Mitochondria and apicoplast of *Plasmodium falciparum*: behaviour on subcellular fractionation and the implication. *Mitochondrion* **7**, 125-132.
- Kocken, C. H., Jansen, J., Kaan, A. M., Beckers, P. J., Ponnudurai, T., Kaslow, D. C., Konings, R. N. und Schoenmakers, J. G.** (1993). Cloning and expression of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **61**, 59-68.
- Kohlhepp, F.** (2009). Die Expression der PfCCp-Multiadhäsionsproteine in den Transmissionsstadien des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*. Diplomarbeit. 1-118.
- Komisar, J. L.** (2007). Malaria vaccines. *Front Biosci* **12**, 3928-3955.
- Kongkasuriyachai, D., Fujioka, H. und Kumar, N.** (2004). Functional analysis of *Plasmodium falciparum* parasitophorous vacuole membrane protein (Pfs16) during gametocytogenesis and gametogenesis by targeted gene disruption. *Mol Biochem Parasitol* **133**, 275-285.
- Kraemer, S. M. und Smith, J. D.** (2006). A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol* **9**, 374-80.
- Krishna, S., Woodrow, C. J., Staines, H. M., Haynes, R. K. und Mercereau-Puijalon O.** (2006). Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. *Trends Mol Med*, **12**, 200-5.

- Kühn, A.** (2007). Molekulare Wechselwirkungen von sexualstadienspezifischen Proteinen im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* und die Wirkung des Signalmoleküls Xanthurensäure während Befruchtungsvorgängen. Diplomarbeit. 1-99.
- Kumar, N.** (1987). Target antigens of malaria transmission blocking immunity exist as a stable membrane bound complex. *Parasite Immunol* **9**, 321-335.
- Kumar, N. und Wizel, B.** (1992). Further characterization of interactions between gamete surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **53**, 113-120.
- Kumar, S., Guha, M., Choubey, V., Maity, P. und Bandyopadhyay, U.** (2007). Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (beta-hematin) formation: a mechanistic update. *Life Sci* **80**, 813-28.
- Lämml, U. K.** (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lalitha, P. V., Biswas, S., Pillai, C. R. und Saxena, R. K.** (2008). Immunogenicity of a recombinant malaria vaccine candidate, domain I+II of AMA-1 ectodomain, from Indian *P. falciparum* alleles. *Vaccine* **26**, 4526-35.
- Lanfrancotti, A., Bertuccini, L., Silvestrini, F. und Alano, P.** (2007). *Plasmodium falciparum*: mRNA co-expression and protein co-localisation of two gene products upregulated in early gametocytes. *Exp Parasitol* **116**, 497-503.
- Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J. S., Vermunt, A. M., Pain, A., Sauerwein, R. W., Eling, W. M., Hall, N., Waters, A. P., Stunnenberg, H. G. et al.** (2002). Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature* **419**, 537-542.
- Lavazec, C. und Bourgoïn, C.** (2008). Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting *Plasmodium* development. *Microbes Infect* **10**, 845-9.
- Lavazec, C., Bonnet, S., Thiery, I., Boisson, B. und Bourgoïn, C.** (2005). cpbAg1 encodes an active carboxypeptidase B expressed in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* **14**, 163-74.
- Lavazec, C., Boudin, C., Lacroix, R., Bonnet, S., Diop, A., Thiberge, S., Boisson, B., Tahar, R. und Bourgoïn, C.** (2007) Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine. *Infect Immun* **75**, 1635-42.
- Lavazec, C., Moreira, C. K., Mair, G. R., Waters, A. P., Janse, C. J. und Templeton, T. J.** (2009). Analysis of mutant *Plasmodium berghei* parasites lacking expression of multiple PbCCp genes. *Mol Biochem Parasitol*, **163**,1-7.
- Le Bras, J. und Durand, R.** (2003). The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* **17**, 147-153.
- Lecaille, F., Kaleta, J. und Brömme, D.** (2002). Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* **102**, 4459-4488.

- Le Roch, K. G., Zhou, Y., Blair, P. L., Grainger, M., Moch, J. K., Haynes, J. D., De La Vega, P., Holder, A. A., Batalov, et al.** (2003). Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* **301**, 1503-8.
- Liepinsh, E., Trexler, M., Kaikkonen, A., Weigelt, J., Banyai, L., Patthy, L. und Otting, G.** (2001). NMR structure of the LCCL domain and implications for DFNA9 deafness disorder. *EMBO J* **20**, 5347-5353.
- Lingnau, A., Margos, G., Maier, W. A. und Seitz, H. M.** (1993). The effects of hormones on the gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Appl Parasitol* **34**, 153-160.
- Löscher, T., Hoelscher, M. und Nothdurft, H. D.** (2003). Malaria-treatment. *Dtsch Med Wochenschr* **128**, 1294-1296.
- Low, H., Lye, Y. M. und Sim, T. S.** (2007) Pfnek3 functions as an atypical MAPKK in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun* **21**, 439-44.
- Lucius, R. und Loos-Frank, B.** (2008). *Biologie von Parasiten*; Springer Verlag, Berlin, 2. Auflage, 177-233.
- Lye, Y. M., Chan, M. und Sim, T. S.** (2006). Pfnek3: an atypical activator of a MAP kinase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett* **580**, 6083-6092.
- Mair, G. R., Braks, J. A., Garver, L. S., Wiegant, J. C., Hall, N., Dirks, R. W., Khan, S. M., Dimopoulos, G., Janse, C. J. und Waters, A. P.** (2006). Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science* **313**, 667-669.
- Malkin, E. M., Diemert, D. J., McArthur, J. H., Perreault, J. R., Miles, A. P., Giersing, B. K., Mullen, G. E., Orcutt, A., Muratova, O., Awkal, M. et al.** (2005a). Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* **73**, 3677-3685.
- Malkin, E. M., Durbin, A. P., Diemert, D. J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, K., Long, C. A., Lambert, L., Miles, A. P., Wang, J. et al.** (2005b). Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* **23**, 3131-3138.
- Makler, M. T. und Hinrichs, D. J.** (1993). Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* **48**, 205-10.
- Makler, M. T., Piper, R. C. und Milhous, W. K.** (1998). Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. *Parasitol Today* **14**, 376-7.
- Mamoun, C. B., Gluzman, I. Y., Goyard, S., Beverley, S. M. und Goldberg, D. E.** (1999). A set of independent selectable markers for transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8716-20.
- Margos, G., Navarette, S., Butcher, G., Davies, A., Willers, C., Sinden, R. E. und Lachmann, P. J.** (2001). Interaction between host complement and mosquito-midgut-stage *Plasmodium berghei*. *Infect. Immun.* **69**, 5064-71.

- Marshall, V. M., Zhang, L., Anders, R. F. und Coppel, R. L.** (1996). Diversity of the vaccine candidate AMA-1 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **77**, 109-113.
- Martin, R. E. und Kirk, K.** (2004). The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Mol Biol Evol* **21**, 1938-49.
- Martin, S. K., Jett, M. und Schneider, I.** (1994). Correlation of phosphoinositide hydrolysis with exflagellation in the malaria microgametocyte. *J Parasitol* **80**, 371-378.
- Matuschewski, K. und Mueller, A. K.** (2007). Vaccines against malaria - an update. *FEBS J* **274**, 4680-7.
- Menendez, C., Ordi, J., Ismail, M. R., Ventura, P. J., Aponte, J. J., Kahigwa, E., Font, F. und Alonso, P. L.** (2000). The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* **181**, 1740-1745.
- Micale, N., Kozikowski, A. P., Ettari, R., Grasso, S., Zappalà, M., Jeong, J. J., Kumar, A., Hanspal, M. und Chishti, A. H.** (2006). Novel peptidomimetic cysteine protease inhibitors as potential antimalarial agents. *J Med Chem* **49**, 3064-3067.
- Moelans, I. I., Meis, J. F., Kocken, C., Konings, R. N. und Schoenmakers, J. G.** (1991). A novel protein antigen of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, located on the surface of gametes and sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* **45**, 193-204.
- Motard, A., Landau, I., Nussler, A., Grau, G., Baccam, D., Mazier, D. und Targett, G. A.** (1993). The role of reactive nitrogen intermediates in modulation of gametocyte infectivity of rodent malaria parasites. *Parasite Immunol* **15**, 21-26.
- Moreira, C. K., Templeton, T. J., Lavazec, C., Hayward, R. E., Hobbs, C. V., Kroeze, H., Janse, C. J., Waters, A. P., Sinnis, P. und Coppi, A.** (2008). The *Plasmodium* TRAP/MIC2 family member, TRAP-Like Protein (TLP), is involved in tissue traversal by sporozoites. *Cell Microbiol* **10**, 1505-16.
- Mourez M., Lacy D. B., Cunningham K., Legmann R., Sellman B. R., Mogridge J. und Collier R. J.** (2002). 2001: a year of major advances in anthrax toxin research. *Trends Microbiol* **10**, 287-93.
- Mueller, A. K., Labaied, M., Kappe, S. H. und Matuschewski, K.** (2005). Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* **433**, 164-7.
- Muller, W. E.** (1997). Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from cDNA analyses in the marine sponge *Geodia cydonium*: a review. *Cell Tissue Res* **289**, 383-395.
- Muta, T., Miyata, T., Misumi, Y., Tokunaga, F., Nakamura, T., Toh, Y., Ikehara, Y. und Iwanaga, S.** (1991). Limulus factor C. An endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. *J Biol Chem* **266**, 6554-65561.

- Nacher, M., Singhasivanon, P., Silachamroon, U., Treeprasertsuk, S., Tosukhowong, T., Vannaphan, S., Gay, F., Mazier, D. und Loareesuwan, S.** (2002). Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage. *J Parasitol* **88**, 97-101.
- Nakamura, T., Tokunaga, F., Morita, T. und Iwanaga, S.** (1988). Interaction between lipopolysaccharide and intracellular serine protease zymogen, factor C, from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes. *J Biochem (Tokyo)* **103**, 370-374.
- Narum, D. L. und Thomas, A. W.** (1994). Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* **67**, 59-68.
- Narum, D. L., Ogun, S. A., Thomas, A. W. und Holder, A. A.** (2000). Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. *Infect Immun* **68**, 2899-2906.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. und Mosinger, E.** (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol* **108**, 17-27.
- Nijhout, M. M. und Carter, R.** (1978). Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro. *Parasitology* **76**, 39-53.
- Ockenhouse, C. F., Angov, E., Kester, K. E., Diggs, C., Soisson, L., Cummings, J. F., Stewart, A. V., Palmer, D. R., Mahajan, B., Krzych, U. et al.** (2006). Phase I safety and immunogenicity trial of FMP1/AS02A, a *Plasmodium falciparum* MSP-1 asexual blood stage vaccine. *Vaccine* **24**, 3009-3017.
- Ogwan'g, R., Mwangi, J., Gachihi, G., Nwachukwu, A., Roberts, C. R. und Martin, S. K.** (1993). Use of pharmacological agents to implicate a role for phosphoinositide hydrolysis products in malaria gamete formation. *Biochem Pharmacol* **46**, 1601-1606.
- Otto, H. H. und Schirmeister, T.** (1997) Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem Rev* **97**, 133-172.
- Outchkourov N. S., Roeffen W., Kaan A., Jansen J., Luty A., Schuiffel D., van Gemert G.J., van de Vegte-Bolmer M., Sauerwein R. W. und Stunnenberg H.G.** (2008). Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 4301-5.
- Outchkourov, N., Vermunt, A., Jansen, J., Kaan, A., Roeffen, W., Teelen, K., Lasonder, E., Braks, A., van de Vegte-Bolmer, M. und Qiu, L. Y. et al.** (2007). Epitope analysis of the malaria surface antigen pfs48/45 identifies a subdomain that elicits transmission blocking antibodies. *J Biol Chem* **282**, 17148-17156.

- Owusu-Agyei, S., Asante, K. P., Owusu, R., Adjuik, M., Amenga-Etego, S., Dosoo, D. K., Gyapong, J., Greenwood, B. und Chandramohan, D.** (2008) An open label, randomised trial of artesunate+amodiaquine, artesunate+chlorproguanil-dapsone and artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated malaria. *PLoS ONE* **3**, e2530.
- Palfrey, H. C. und Leung, S.** (1993). Inhibition of Na-K-2Cl cotransport and bumetanide binding by ethacrynic acid, its analogues, and adducts. *Am J Physiol* **264**, 1270-7.
- Pancer, Z.** (2000). Dynamic expression of multiple scavenger receptor cysteine-rich genes in coelomocytes of the purple sea urchin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13156-13161.
- Pangburn, M. K.** (2000). Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology* **49**, 149-157.
- Paton, M. G., Barker, G. C., Matsuoka, H., Ramesar, J., Janse, C. J., Waters, A. P. und Sinden, R. E.** (1993). Structure and expression of a post-transcriptionally regulated malaria gene encoding a surface protein from the sexual stages of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol* **59**, 263-275.
- Peterson, M. G., Marshall, V. M., Smythe, J. A., Crewther, P. E., Lew, A., Silva, A., Anders, R. F. und Kemp, D. J.** (1989). Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* **9**, 3151-3154.
- Plebanski, M., Lee, E. A., Hannan, C. M., Flanagan, K. L., Gilbert, S. C., Gravenor, M. B. und Hill, A. V.** (1999). Altered peptide ligands narrow the repertoire of cellular immune responses by interfering with T-cell priming. *Nat Med* **5**, 565-571.
- Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A. D. und Meuwissen, J. H.** (1981). Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to in vitro culture. *Trop Geogr Med* **33**, 50-54.
- Ponte-Sucre, A., Vicik, R., Schultheis, M., Schirmeister, T. und Moll, H.** (2006). Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2439-47.
- Ponting, C. P. und Russell, R. B.** (2000). Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *J Mol Biol* **302**, 1041-1047.
- Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekiei, O. D. und James, K. E.** (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* **102**, 4639-4750.
- Pradel, G.** (2007). Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology* **134**, 1911-1929.
- Pradel, G., und Templeton, T. J.** (2006). Genomics of pathogenic parasites. In: Dobrindt, U., Hacker, J. H. (Eds.), *Pathogenomics - Genome Analysis of Pathogenic Microbes*. Wiley-VCH, Weinheim, S. 417-444.

- Pradel, G., Hayton, K., Aravind, L., Iyer, L. M., Abrahamsen, M. S., Bonawitz, A., Mejia, C. und Templeton, T. J.** (2004). A multidomain adhesion protein family expressed in *Plasmodium falciparum* is essential for transmission to the mosquito. *J Exp Med* **199**, 1533-1544.
- Pradel, G., Wagner, C., Mejia, C. und Templeton, T. J.** (2006). *Plasmodium falciparum*: Co-dependent expression and co-localization of the PfCCp multi-adhesion domain proteins. *Exp Parasitol* **112**, 263-268.
- Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L. und Jarra, W.** (2000) The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* **2**, 1461-1477.
- Quakyi, I. A., Carter, R., Renner, J., Kumar, N., Good, M. F. und Miller, L. H.** (1987). The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. *J Immunol* **139**, 4213-4217.
- Quashie, N. B., de Koning, H. P. und Ranford-Cartwright, L. C.** (2006). An improved and highly sensitive microfluorimetric method for assessing susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in vitro. *Malar J* **5**, 95.
- Raine, J. D., Ecker, A., Mendoza, J., Tewari, R., Stanway, R. R. und Sinden, R. E.** (2007). Female inheritance of malarial lap genes is essential for mosquito transmission. *PLoS Pathog* **3**, e30.
- Ramharter, M., Noedi, H., Thimasarn, K., Wiedermann, G., Wernsdorfer, G. und Wernsdorfer, W. H.** (2002) In vitro activity of tafenoquine alone and in combination with artemisinin against *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **67**, 39-43.
- Rangarajan, R., Bei, A. K., Jethwaney, D., Maldonado, P., Dorin, D., Sultan, A. A. und Doerig, C.** (2005). A mitogen-activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep* **6**, 464-469.
- Raphael, P., Takakuwa, Y., Manno, S., Liu, S. C., Chishti, A. H. und Hanspal, M.** (2000). A cysteine protease activity from *Plasmodium falciparum* cleaves human erythrocyte ankyrin. *Mol Biochem Parasitol* **110**, 259-272.
- Rawlings, D. J., Fujioka, H., Fried, M., Keister, D. B., Aikawa, M. und Kaslow, D. C.** (1992). Alpha-tubulin II is a male-specific protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **56**, 239-250.
- Read, D., Lensen, A. H., Begarnie, S., Haley, S., Raza, A. und Carter, R.** (1994). Transmission-blocking antibodies against multiple, non-variant target epitopes of the *Plasmodium falciparum* gamete surface antigen Pfs230 are all complement fixing. *Parasite Immunol* **16**, 511-519.
- Reed, M. B., Saliba, K. J., Caruana, S. R., Kirk, K. und Cowman, A. F.** (2000). Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **403**, 906-909.

- Reininger, L., Billker, O., Tewari, R., Mukhopadhyay, A., Fennell, C., Dorin-Semlat, D., Doerig, C., Goldring, D., Harmse, L., Ranford-Cartwright, L. et al.** (2005). A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *J Biol Chem* **280**, 31957-31964.
- Rener, J., Graves, P. M., Carter, R., Williams, J. L. und Burkot, T. R.** (1983). Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* **158**, 976-981.
- Resnick, D., Pearson, A. und Krieger, M.** (1994). The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* **19**, 5-8.
- Richie, T. L. und Saul, A.** (2002). Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* **415**, 694-701.
- Robertson, N. G., Skvorak, A. B., Yin, Y., Weremowicz, S., Johnson, K. R., Kovatch, K. A., Battey, J. F., Bieber, F. R. und Morton, C. C.** (1997). Mapping and characterization of a novel cochlear gene in human and in mouse: a positional candidate gene for a deafness disorder, DFNA9. *Genomics* **46**, 345-354.
- Robertson, N. G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S. N., Eavey, R. D., McKenna, M., Nadol, J. B., Jr., Miyamoto, R. T., Linthicum, F. H., Jr., Lubianca Neto, J. F. et al.** (1998). Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* **20**, 299-303.
- Rosenberg, R., Wirtz, R. A., Schneider, I. und Burge, R.** (1990). An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**, 209-212.
- Rosenthal, P. J., McKerrow, J. H., Aikawa, M., Nagasawa, H. und Leech, J. H.** (1988). A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *J Clin Invest* **82**, 1560-1566.
- Rosenthal P. J.** (2004). Cysteine proteases of malaria parasites. *Int J Parasitol* **34**, 1489-99.
- Rupp, I., Bosse, R., Schirmeister, T. und Pradel, G.** (2008). Effect of protease inhibitors on gamete formation in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **158**, 208-12.
- Rupp, I., Sologub, L., Eksi, S., Williamson, K. C., Kombila, D. U., Frank, M. und Pradel, G.** (Manuskript eingereicht). Malaria parasites form filamentous cell-to-cell connections during reproduction in the mosquito midgut. *J Cell Sci*.
- Russell, D. G. und Sinden, R. E.** (1981). The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J Cell Sci* **50**, 345-59.
- Sacarlal J., Aponte J. J., Aide P., Mandomando I., Bassat Q., Guinovart C., Leach A., Milman J., Macete E., Espasa M. et al.** (2008). Safety of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children during a Phase IIb trial. *Vaccine* **26**, 174-84.
- Sachs, J. und Malaney, P.** (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature* **415**, 680-685.

- Saliba, K. J., Folb, P. I. und Smith, P. J.** (1998). Role for the plasmodium falciparum digestive vacuole in chloroquine resistance. *Biochem Pharmacol* **56**, 313-20.
- Saliba, K. J. und Kirk, K.** (2001). Nutrient acquisition by intracellular apicomplexan parasites: staying in for dinner. *Int J Parasitol* **31**, 1321-1330.
- Sajid, M. und McKerrow, J. H.** (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* **120**, 1-21.
- Sauerwein, R. W.** (2007). Malaria transmission-blocking vaccines: the bonus of effective malaria control. *Microbes Infect* **9**, 792-795.
- Saul, A.** (2007). Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. *Curr Opin Infect Dis* **20**, 476-481.
- Saute, F., Menendez, C., Mayor, A., Aponte, J., Gomez-Olive, X., Dgedge, M. und Alonso, P.** (2002). Malaria in pregnancy in rural Mozambique: the role of parity, submicroscopic and multiple Plasmodium falciparum infections. *Trop Med Int Health* **7**, 19- 28.
- Schirmeister, T. und Kaeppler, U.** (2003). Non-peptidic inhibitors of cysteine proteases. *Mini Rev Med Chem* **3**, 361-73.
- Schlitzer, M.** (2007). Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development. *ChemMedChem* **2**, 944-986.
- Schlitzer, M.** (2008). Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. *Arch Pharm* **341**, 149-63.
- Schneweis, S., Maier, W. A. und Seitz, H. M.** (1991). Haemolysis of infected erythrocytes – a trigger for formation of Plasmodium falciparum gametocytes? *Parasitol Res* **77**, 458-460.
- Schönfeld, M., Barreto, M. I, Schunk, M., Maduhu, I., Maboko, L., Hoelscher, M., Berens-Riha, N., Kitua, A. und Löscher, T.** (2007). Molecular surveillance of drug-resistance associated mutations of Plasmodium falciparum in south-west Tanzania. *Malar J* **6**, 2.
- Scholz, S.M., Dude, M.-A. und Pradel, G.** (2005). Malaria – vom Genom zum Impfstoff. *Bioforum* **28** (10), 71-73.
- Scholz, S. M., Simon, N., Lavazec, C., Dude, M. A., Templeton, T. J. und Pradel, G.** (2008). PfCCp proteins of Plasmodium falciparum: Gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *Int J Parasitol*, **38**, 327-40.
- Schulz, F., Gelhaus, C., Degel, B., Vicik, R., Heppner, S., Breuning, A., Leippe, M., Gut, J., Rosenthal, P. J. und Schirmeister, T.** (2007). Screening of protease inhibitors as antiplasmodial agents. Part I: aziridines and epoxides. *Chem Med Chem* **2**, 1214–1224.
- Severini ,C., Silvestrini, F., Sannella, A., Barca, S., Gradoni, L. und Alano, P.** (1999). The production of the osmiophilic body protein Pfg377 is associated with stage of maturation and sex in Plasmodium falciparum gametocytes. *Mol Biochem Parasitol* **100**, 247-252.

- Shenai, B. R., Sijwali, P. S., Singh, A. und Rosenthal, P. J.** (2000). Characterization of native and recombinant facipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **275**, 29000-29010.
- Shenai, B. R., Lee, B. J., Alvarez-Hernandez, A., Chong, P. Y., Emal, C. D., Neitz, R. J., Roush, W. R. und Rosenthal, P. J.** (2003). Structure-activity relationships for inhibition of cysteine protease activity and development of *Plasmodium falciparum* by peptidyl vinyl sulfones. *Antimicrob. Agents Chemother* **47**, 154–160.
- Siddiqui, W. A., Tam, L. Q., Kramer, K. J., Hui, G. S., Case, S. E., Yamaga, K. M., Chang, S. P., Chan, E. B. und Kan, S. C.** (1987). Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3014-3018.
- Siden-Kiamos, I., Ecker, A., Nyback, S., Louis, C., Sinden, R. E. und Billker, O.** (2006). *Plasmodium berghei* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol Microbiol* **60**, 1355-1363.
- Sijwali, P. S., Brinen, L. S. und Rosenthal, P. J.** (2001). Systematic optimization of expression and refolding of the *Plasmodium falciparum* cysteine protease facipain-2. *Protein Expr Purif* **22**, 128-134.
- Sijwali, P. S., Kato, K., Seydel, K. B., Gut, J., Lehmann, J., Klemba, M., Goldberg, D. E., Miller, L. H. und Rosenthal, P. J.** (2004). *Plasmodium falciparum* cysteine protease facipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8721-8726.
- Sijwali, P. S. und Rosenthal, P. J.** (2004). Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease facipain-2 in hemoglobin hydrolysis by *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 4384-4389.
- Silvestrini, F., Bozdech, Z., Lanfrancotti, A., Di Giulio, E., Bultrini, E., Picci, L., Derisi, J. L., Pizzi, E. und Alano, P.** (2005). Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **143**, 100-110.
- Simon, N., Scholz, S. M., Moreira, C., Templeton, J., Kuehn, A., Dude, M.-A. und Pradel, G.** (2009). Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **284**, 14537-46.
- Sinden, R. E.** (1982). Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: an electron microscopic study. *Parasitology* **84**, 1-11.
- Sinden, R. E.** (1983). The cell biology of sexual development in plasmodium. *Parasitology* **86** (Bd. 4), 7-28.
- Sinden, R. E.** (1999). *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parasitologia* **41**, 139-148.
- Sinden, R. E. und Billingsley, P. F.** (2001). *Plasmodium* invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol* **17**, 209-212.

- Sinden, R. E., Canning, E. U., Bray, R. S. und Smalley, M. E.** (1978). Gametocyte and gamete development in *Plasmodium falciparum*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **201**, 375-399.
- Singh, N., Sijwali, P. S., Pandey, K. C. und Rosenthal, P. J.** (2006). *Plasmodium falciparum*: biochemical characterization of the cysteine protease falcipain-2. *Exp Parasitol* **112**, 187-192.
- Sinnis P. und Coppi A.** (2007) A long and winding road: the *Plasmodium* sporozoite's journey in the mammalian host. *Parasitol Int* **56**, 171-8.
- Slater, A. F., Swiggard, W. J., Orton, B. R., Flitter, W. D., Goldberg, D. E., Cerami, A. und Henderson, G. B.** (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 325-329.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y. und Hay, S. I.** (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria, *Nature* **434**, 214–217.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Mutheu, J. J. und Hay, S. I.** (2008). International funding for malaria control in relation to populations at risk of stable *Plasmodium falciparum* transmission. *PLoS Med* **5**, 1068-1078.
- Spraggon G., Everse S. J. und Doolittle R. F.** (1997) Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* **389**, 455-62.
- Steffensen, B., Wallon, U. M. und Overall, C. M.** (1995). Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem* **270**, 11555-66.
- Steffensen, B., Xu. X., Martin, P. A. und Zardeneta, G.** (2002). Human fibronectin and MMP-2 collagen binding domains compete for collagen binding sites and modify cellular activation of MMP-2. *Matrix Biol*, **21**, 399-414.
- Steketee, R. W., Nahlen, B. L., Parise, M. E. und Menendez, C.** (2001). The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* **64**, 28-35.
- Stoute, J. A., Gombe, J., Withers, M. R., Siangla, J., McKinney, D., Onyango, M., Cummings, J. F., Milman, J., Tucker, K., Soisson, L. et al.** (2007). Phase 1 randomized double-blind safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* malaria merozoite surface protein FMP1 vaccine, adjuvanted with AS02A, in adults in western Kenya. *Vaccine* **25**, 176-184.
- Stowers, A. und Carter, R.** (2001). Current developments in malaria transmission-blocking vaccines. *Expert Opin Biol Ther* **1**, 619-628.
- Stratton, L., O'Neill, M. S., Kruk, M. E. und Bell, M. L.** (2008). The persistent problem of malaria: Addressing the fundamental causes of a global killer. *Soc Sci Med* **67**, 854-62.
- Sturm, A. und Heussler, V.** (2007). Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic *Plasmodium* parasites. *Med Microbiol Immunol* **196**, 127–133.

- Talman, A. M., Domarle, O., McKenzie, F. E., Arie, F. und Robert, V.** (2004). Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* **3**, 24.
- Templeton, T. J., Fujioka, H., Aikawa, M., Parker, K. C. und Kaslow, D. C.** (1997). *Plasmodium falciparum* Pfs40, renamed Pf39, is localized to an intracellular membrane-bound compartment and is not sexual stage-specific. *Mol Biochem Parasitol* **90**, 359-365.
- Templeton, T. J., Keister, D. B., Muratova, O., Procter, J. L. und Kaslow, D. C.** (1998). Adherence of erythrocytes during exflagellation of *Plasmodium falciparum* microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycophorins. *J Exp Med* **187**, 1599-1609.
- Templeton, T. J., Kaslow, D. C. und Fidock, D. A.** (2000). Developmental arrest of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* within the mosquito midgut via CTRP gene disruption. *Mol Microbiol* **36**, 1-9.
- Templeton, T. J., Iyer, L. M., Anantharaman, V., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Subramanian, G. M., Hoffman, S. L., Abrahamsen, M. S. und Aravind, L.** (2004). Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. *Genome Res* **14**, 1686-1695.
- Tewari, R., Dorin, D., Moon, R., Doerig, C. und Billker, O.** (2005). An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol* **58**, 1253-1263.
- Tomas, A. M., Margos, G., Dimopoulos, G., van Lin, L. H., de Koning-Ward, T. F., Sinha, R., Lupetti, P., Beetsma, A. L., Rodriguez, M. C., Karras, M. et al.** (2001). P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J* **20**, 3975-3983.
- Torres, J. A., Rodriguez, M. H., Rodriguez, M. C. und de la Cruz Hernandez-Hernandez, F.** (2005). *Plasmodium berghei*: effect of protease inhibitors during gametogenesis and early zygote development. *Exp Parasitol* **111**, 255-259.
- Trager, W. und Jensen, J. B.** (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673-675.
- Trager, W. und Gill, G. S.** (1992). Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Protozool* **39**, 429-432.
- Trager, W., Gill, G. S., Lawrence, C. und Nagel, R. L.** (1999). *Plasmodium falciparum*: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. *Exp Parasitol* **91**, 115-118.
- Trexler, M., Banyai, L. und Patthy, L.** (2000). The LCCL module. *Eur J Biochem* **267**, 5751-5757.
- Trottein, F., Triglia, T. und Cowman, A. F.** (1995). Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Mol Biochem Parasitol* **74**, 129-141.

- Trueman, H. E., Raine, J. D., Florens, L., Dessens, J. T., Mendoza, J., Johnson, J., Waller, C. C., Delrieu, I., Holders, A. A., Langhorne, J. et al.** (2004). Functional characterization of an LCCL-lectin domain containing protein family in *Plasmodium berghei*. *J Parasitol* **90**, 1062-1071.
- Tsai, Y. L., Hayward, R. E., Langer, R. C., Fidock, D. A. und Vinetz, J. M.** (2001). Disruption of *Plasmodium falciparum* chitinase markedly impairs parasite invasion of mosquito midgut. *Infect Immun* **69**, 4048-4054.
- Valderramos, S. G. und Fidock, D. A.** (2006) Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 594-601.
- Vale, N., Matos, J., Gut, J., Nogueira, F., do Rosário, V., Rosenthal, P. J., Moreira, R. und Gomes, P.** (2008). Imidazolidin-4-one peptidomimetic derivatives of primaquine: synthesis and antimalarial activity. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 4150-3.
- van Dijk, M. R., Janse, C. J., Thompson, J., Waters, A. P., Braks, J. A., Dodemont, H. J., Stunnenberg, H. G., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W. und Eling, W.** (2001). A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell* **104**, 153-164.
- van Schaijk, B. C., van Dijk, M. R., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G. J., van Dooren, M. W., Eksi, S., Roeffen, W. F., Janse, C. J., Waters, A. P. und Sauerwein, R. W.** (2006). Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45, is a female specific surface protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **149**, 216-222.
- Vermeulen, A. N., Ponnudurai, T., Beckers, P. J., Verhave, J. P., Smits, M. A. und Meuwissen, J. H.** (1985). Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med* **162**, 1460-1476.
- Vermeulen, A. N., van Deursen, J., Brakenhoff, R. H., Lensen, T. H., Ponnudurai, T. und Meuwissen, J. H.** (1986). Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. *Mol Biochem Parasitol* **20**, 155-163.
- Vicik, R., Busemann, M., Gelhaus, C., Stiefl, N., Scheiber, J., Schmitz, W., Schulz, F., Mladenovic, M., Engels, B., Leippe, M., Baumann, K. und Schirmeister, T.** (2006) Aziridide-based inhibitors of cathepsin L: synthesis, inhibition activity, and docking studies. *Chem Med Chem*, **1**, 1126-1141.
- Wagner, C., Scholz, S. M., Abreu, A., Frank, R., Templeton, T. J. und Pradel, G.** (2006). Molecular interactions between PfCCp multidomain adhesion proteins during gametogenesis in *Plasmodium falciparum*. In: *Proceedings of the ICOPA XI Meeting*, Medimond, S. 631-635.
- Waller, R. F., Keeling, P. J., van Dooren, G. G. und McFadden, G. I.** (2003), Comment on 'A green algal apicoplast ancestor'. *Science* **301**, 49.

- Walliker, D., Quakyi, I. A., Wellems, T. E., McCutchan, T. F., Szarfman, A., London, W. T., Corcoran, L. M., Burkot, T. R. und Carter, R.** (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **236**, 1661-6.
- White, N. J., McGready, R. M. und Nosten, F. H.** (2008). New medicines for tropical diseases in pregnancy: catch-22. *PLoS Med* **17**, 843-844.
- Whitney, G. S., Starling, G. C., Bowen, M. A., Modrell, B., Siadak, A. W. und Aruffo, A.** (1995). The membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site. *J Biol Chem* **270**, 18187-18190.
- Wirth, D. F.** (2002). The parasite genome: Biological revelations. *Nature* **419**, 495-496.
- WHO** (2008). World Malaria Report. 1-35.
- Wiesner, J. und Jomaa, H.** (2007). Isoprenoid biosynthesis of the apicoplast as drug target. *Curr Drug Targets* **8**, 3-13.
- Williams, J. L.** (1999). Stimulation of *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis by conditioned medium from parasite cultures. *Am J Trop Med Hyg* **60**, 7-13.
- Williamson, K. C.** (2003). Pfs230: from malaria transmission-blocking vaccine candidate toward function. *Parasite Immunol* **25**, 351-359.
- Williamson, K. C., Criscio, M. D. und Kaslow, D. C.** (1993). Cloning and expression of the gene for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen, Pfs230. *Mol Biochem Parasitol* **58**, 355-358.
- Williamson, K. C., Keister, D. B., Muratova, O. und Kaslow, D. C.** (1995). Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes. *Mol Biochem Parasitol* **75**, 33-42.
- Williamson, K. C., Fujioka, H., Aikawa, M. und Kaslow, D. C.** (1996). Stage-specific processing of Pfs230, a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. *Mol Biochem Parasitol* **78**, 161-169.
- Withers, M. R., McKinney, D., Ogutu, B. R., Waitumbi, J. N., Milman, J. B., Apollo, O. J., Allen, O. G., Tucker, K., Soisson, L. A., Diggs, C. et al.** (2006). Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clin Trials* **1**, e32.
- Wu, Y., Kirkman, L. A. und Wellems, T. E.** (1996). Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1130-1134.
- Wu, Y., Przywiecki, C., Flanagan, E., Bello-Irizarry, S. N., Ionescu, R., Muratova, O., Dobrescu, G., Lambert, L., Keister, D., Rippeon, Y. et al.** (2006). Sustained high-titer antibody responses induced by conjugating a malarial vaccine candidate to outer-membrane protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18243-18248.

**Wu Y., Ellis R. D., Shaffer D., Fontes E., Malkin E. M., Mahanty S., Fay M. P., Narum D., Rausch K., Miles A. P. et al.** (2008). Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS ONE* **3**, e2636.

**Xu, X., Wang, Y., Lauer-Fields, J. L., Fields, G. B. und Steffensen, B.** (2004). Contributions of the MMP-2 collagen binding domain to gelatin cleavage. Substrate binding via the collagen binding domain is required for hydrolysis of gelatin but not short peptides. *Matrix Biol*, **23**, 171-81.

**Yu, Q., Reichert, M., Brousseau, T., Cleuter, Y., Burny, A. und Kettmann, R.** (1990). Sequence of bovine CD5. *Nucleic Acids Res* **18**, 5296.

**Yuda, M., Sakaida, H. und Chinzei, Y.** (1999). Targeted disruption of the plasmodium berghei CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *J Exp Med* **190**, 1711-1716.

**Yuda, M., Yano, K., Tsuboi, T., Torii, M. und Chinzei, Y.** (2001). von Willebrand Factor A domain-related protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout Plasmodium parasites. *Mol Biochem Parasitol* **116**, 65-72.

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

## Internetseiten

[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

[www.emdbiosciences.com](http://www.emdbiosciences.com)

[www.fermentas.de](http://www.fermentas.de)

[www.ge.com](http://www.ge.com)

[www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

[www.map.ox.ac.uk](http://www.map.ox.ac.uk)

[www.neb.com](http://www.neb.com)

[www.plasmodb.org](http://www.plasmodb.org)

[www.stratagene.com](http://www.stratagene.com)

[www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)

[www.who.int](http://www.who.int)

## 9 Anhang

### Abkürzungen und Einheiten

$A_x$	Absorption bei einer Wellenlänge von x Nanometern
A.	Anopheles
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ACT	<i>Artemisinin based Combination-Therapy</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
AMA	<i>apical membrane antigen</i>
AMP	Ampicillin-Resistenz
Anth	<i>anthrax protective antigen</i>
APAD	3-Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid
ApicA	<i>Apicomplexa specific domain</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bd.	Band
bp	Basenpaare
BRK	Bayerisches Rotes Kreuz
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Fötales Kälberserum
BSD	Blasticidin
bspw.	Beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	Cathepsin A
CB	Cahtepsin B
cDNA	<i>complementary DNA</i>

---

Comp.	<i>Complementation</i>
CRT	<i>chloroquine resistance reporter</i>
CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHPS	Dihydropteroatsynthase
Disc	<i>discoidin</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
evtl.	eventuell
EZM	Erythrozytenmembran
F	Farad, SI-Einheit der elektrischen Kapazität
FN2	Fibronektin-Typ2
FP-2/-3	Falcipain-2/-3
g	Gramm
x g	Fallbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
G6PD	<i>glucose 6 phosphat dehydrogenase</i>
gDNA	genomische DNA
GPI	<i>glycosyl phosphatidly inositol</i>
H <sup>+</sup>	Proton des Wasserstoffs
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2 bidest	zweifach destilliertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hLDH	humane Lactatdehydrogenase

---

HZ	Hämozoin
IB	<i>Inclusion Bodies</i>
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Hemmkonzentration eines Inhibitors
IFA	Immunfluoreszenzstudien
Inkl.	inklusive
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-Thigalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
l	Liter
lat.	lateinisch
LB	Luria-Bertani
LCCL	<i>Limulus Coagulation Factor C</i>
Lev	<i>levanase</i>
LF	<i>lethal factor</i>
LH	<i>lipxygenase-homologue</i>
LSA	Leberstadienantigen
m	Meter bzw. milli
max.	maximal
mm	Millimeter
μ	mikro
M	molar (mol/l)
Min.	Minuten
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSP	<i>merozoite surface protein</i>
n	nano
N	Dimensionssymbol der Stoffmenge (Mol)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form

---

NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NEC	<i>neurexine-collagen</i>
NGS	<i>normal goat serum</i> , Normales Ziegenserum
nm	Nanometer
NV	Nahrungsvakuole
OD	optische Dichte
p	pico
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
p. a.	<i>pro analysi</i>
PA	<i>protective antigen</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PFA	Paraformaldehyd
pLDH	plasmodiale Lactatdehydrogenase
PPM	Parasitenplasmamembran
psi	<i>pounds per square inch</i> , Druckeinheit
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PVM	parasitophore Vakuolenmembran
RESA	<i>ring infected erythrocyte surface antigen</i>
Ric	<i>ricin</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rp	rekombinantes Protein
RPMI-Medium	Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
S.	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfat

---

SFB	Sonderforschungsbereich
Stdw.	Standardabweichung
Sek.	Sekunde
SR	<i>scavenger receptor</i>
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Puffer
TBSM	Milchpulver in TBS
TBV	Transmissionsblockierende Vakzine
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRAP	<i>Thrombospondin-related anonymous protein</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
V	Volt
WARP	<i>Willebrand factor A domain-related protein</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
WMC	Weill Medical College
WT	Wildtyp
3'-UTR	untranslatierte Region am 3'-Ende eines DNA-Stranges
z. B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1. Geographische Verbreitung der durch *P. falciparum* verursachten Malaria tropica.  
Quelle: <http://www.map.ox.ac.uk>, verändert.
- Abb. 1.2. Schematische Darstellung eines Merozoiten von *P. falciparum*. Quelle: Bannister *et al.*, 2000, verändert.
- Abb. 1.3. Schematische Darstellung der Entwicklung von *Plasmodium falciparum* im menschlichen Zwischenwirt (a) und im Mücken-Endwirt (b). Quelle: Cowman und Crabb, 2006, verändert.
- Abb. 1.4. Die fünf Stadien der *P.-falciparum*-Gametozyten. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 1.5. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines *P.-falciparum*-Gametozyten. Quelle: Dr. phil. nat. G. Pradel, verändert.
- Abb. 1.6. Lichtmikroskopische Aufnahme eines *in vitro* erzeugten Exflagellationszentrums (400-fache Vergrößerung). Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 1.7. Übersicht der drei Vakzinenstrategien in der Malariaforschung. Quelle: Richie und Saul, 2002, verändert.
- Abb. 1.8. Aufbau der PfCCp-Multiadhäsionsdomänenproteine. Quelle: Dr. phil. nat. G. Pradel, verändert.
- Abb. 1.9. Expression von PfCCp1, PfCCp2, PfCCp3 und PfCCp4 in Gametozyten. Quelle: Scholz *et al.*, 2008.
- Abb. 1.10. Freisetzung und matrixähnliche Anordnung um Exflagellationskomplexe von PfCCp1 während der Gametenbildung. Quelle: Pradel *et al.*, 2004.
- Abb. 1.11. Zielstrukturen der Antimalariamedikamente in asexuellen *Plasmodium*-Blutstadien. Greenwood *et al.*, 2008, verändert.
- Abb. 1.12. Hämoglobinabbau durch *P. falciparum*. Quelle: M.-A. Dude, kombiniert nach Coombs *et al.*, 2001 und Drew *et al.*, 2008.
- Abb. 1.13. Strukturformel der peptidomimetischen FP-2-Inhibitoren basierend auf einem 1,4-Benzodiazepin-Grundgerüst. Ettari *et al.*, 2008, verändert.
- Abb. 1.14. Ansatzpunkte für die Modifizierung der Etacrynsäure-Leitstruktur. Quelle: Dude *et al.*, 2008.
- Abb. 2.1. pSUMO/pSMT3-Expressionsvektor mit multipler Klonierungsstelle zur Herstellung von 6xHIS-Fusionsproteinen. Quelle: [www.emdbiosciences.com](http://www.emdbiosciences.com), verändert.
- Abb. 2.2. pGEX-4T-1-Expressionsvektor mit multipler Klonierungsstelle zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen. Quelle: [www.ge.com](http://www.ge.com), verändert.
- Abb. 2.3. pBluescript-Vektor als Basis des pDT-Tg23-KO-Vektors. Quelle: [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com).
- Abb. 2.4. pCAM-BSD-KO-Vektor mit multipler Klonierungsstelle zur Herstellung von *P.-falciparum*-KO-Parasiten. Quelle: Dorin-Semblat *et al.*, 2007, verändert.
- Abb. 2.5. pCAM-BSD-Comp-Vektor zur Herstellung von *P.-falciparum*-Comp-Parasiten. Quelle: Dorin-Semblat *et al.*, 2007, verändert.

- Abb. 2.6. DNA-Längen- und Proteinmassenstandards von MBI/Fermentas. Quelle: [www.fermentas.de](http://www.fermentas.de).
- Abb. 2.7. A Membranfütterung von *Anopheles stephensi* Mücken mittels einer Saugglocke. Quelle: Prof. Dr. rer. nat. T. J. Templeton. B. Nomenklatur der Körperabschnitte einer *Anopheles*-Mücke. Quelle: [www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org), verändert.
- Abb. 2.8. Blutausstrich. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 2.9. Percoll<sup>®</sup>-Dichtegradient nach Auftrennung einer *P. falciparum*-Blutkultur. Quelle: A. Kühn, verändert.
- Abb. 2.10. Schema eines Accudenz<sup>™</sup>-Gradienten zur Aufreinigung von Gameten und Zygoten vor (links) und nach (rechts) Dichtezentrifugation. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 2.11. Schema zur Herstellung von PfCCp-KO-Parasiten unter Verwendung des pDT-Tg23-Vektors und der relativen Position der verwendeten Primer. Quelle: Pradel *et al.*, 2004, verändert.
- Abb. 2.12. Schema zur Herstellung von PfCCp-KO-Parasiten unter Verwendung des pCAM-BSD-KO-Vektors und der relativen Position der verwendeten Primer. Quelle: Dorin-Semlat *et al.*, 2007, verändert.
- Abb. 2.13. Schema zur Herstellung von PfCCp-Comp-Parasiten unter Verwendung des pCAM-BSD-Comp-Vektors. Quelle: M.-A. Dude, nach Dorin-Semlat *et al.*, 2007.
- Abb. 2.14. Schematische Darstellung einer Immunfluoreszenz. Quelle: Dr. rer. nat. S. M. Scholz, verändert.
- Abb. 2.15. Schema eines Zuschnitts einer in Epon eingebetteten Probe. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 2.16. Relative Position sowie die Länge der Genabschnitte zur Klonierung domänenspezifischer, rekombinanter PfCCp5- und PfFNPA-Proteine. Quelle: Dr. phil. nat. G. Pradel, verändert.
- Abb. 2.17. Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen. Quelle: M.-A. Dude, nach [www.neb.com](http://www.neb.com).
- Abb. 2.18. Schematische Darstellung einer Ligation. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 2.19. Komponenten der Mini-Trans-Blot-Apparatur und Aufbau eines Western Blots. Quelle: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com), verändert.
- Abb. 2.20. Prinzip einer Ko-Immünpräzipitation am Beispiel von PfCCp5. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 2.21 Schemadarstellung einer Affinitätschromatographie nach dem Köder-Beute-Prinzip. Quelle: N. Simon, verändert.
- Abb. 2.22. Schema zur Herstellung der Verdünnungsreihen der getesteten Inhibitoren für den Vaibilitätstest an asexuellen *P. falciparum*-Blutstadien. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 2.23. Beispiel einer mit Inhibitor inkubierten *P. falciparum*-3D7-Blutkultur nach Durchführung des Malstat-Assays. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.1. Relative Position der amplifizierten DNA-Fragmente zur Herstellung rekombinanter PfCCp5- und PfFNPA-Proteine. Quelle: Dr. phil. nat. G. Pradel, verändert.
- Abb. 3.2. Expressionskontrolle der PfCCp5rp1- und PfCCp5rp2-6His/SUMO-Konstrukte. Quelle: M.-A. Dude.

- Abb. 3.3. Expressionskontrolle der *PfFNPA*rp1- und *PfFNPA*rp2-6His/SUMO-Konstrukte.  
Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.4. Analyse der Proteinaufreinigungen der 6His/SUMO-Fusionsproteine nach Bindung an Nickel-NTA-Agarose. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.5. Analyse der Proteinmenge nach *Inclusion-Body*-Aufreinigung der rekombinanten *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Proteine. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.6. Western-Blot-Analyse der polyklonalen Mausseren an ihren rekombinanten Proteinen.  
Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.7. Western-Blot-Analysen der generierten *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Antiseren an NF54-WT-Lysat aufgereinigter Gametozyten. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.8. Stadienspezifische Transkriptanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA*. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.9. Stadienspezifische Western-Blot-Analysen polyklonaler Mausseren gerichtet gegen *PfCCp5*- und *PfFNPA*. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.10. Expressionsanalysen von *PfCCp5* und *PfFNPA* auf Proteinebene. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.11. Expressionsanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Trophozoiten anhand von Immunfluoreszenzuntersuchungen. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.12. Expressionsanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Schizonten. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.13. Expressionsanalyse von *PfCCp5* und *PfFNPA* in Gameten. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.14. *PfCCp5*-Expressionsanalyse in Zygoten und Ookineten. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.15. *PfFNPA*-Expressionsanalyse in Zygoten und Ookineten. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.16. Immunfluoreszenz-Analysen anhand von konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie zur Untersuchung der Expression von *PfCCp5* und *PfFNPA*. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.17. Ultrastrukturelle Lokalisation von *PfCCp5* und *PfFNPA* in reifen Gametozyten.  
Quelle: Dr. phil. nat. G. Pradel und M.-A. Dude
- Abb. 3.18. Diagnostische PCR zur Überprüfung der Integration des *PfFNPA*-BSD-KO2-Konstrukts. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.19. Expressionsstudien von *PfFNPA* in Gametozyten des *PfFNPA*-BSD-KO2-Klons 1H4.  
Quelle: Simon *et al.*, 2009, verändert.
- Abb. 3.20. Diagnostische PCR zur Überprüfung der Integration der *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Comp-Konstrukte. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.21. Untersuchung der ko-abhängigen *PfCCp5*- und *PfFNPA*-Expression anhand von Western-Blot-Analysen. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.22. *PfCCp1*-abhängige Expression von *PfCCp5*. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.23. *PfCCp1*-abhängige Expression von *PfFNPA*. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.24. Expressionsanalysen von *PfCCp5* und *PfFNPA* in *PfCCp2*- bis 4-KO-Gametozyten.  
Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.25. Ko-Immunpräzipitationen mit *PfCCp5* und *PfFNPA* als Köder. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.26. Ko-Immunpräzipitation mit *PfCCp4* als Köder. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 3.27. Relative Position der klonierten rekombinanten *PfCCp*-Proteine. Quelle: Dr. phil. nat. G. Pradel, verändert.

- Abb. 3.28. Validierung der Testbedingungen des Malstat-Assays mit Hilfe des antiplasmodialen Inhibitors Chloroquin. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 4.1. Übersicht aller bisher nachgewiesenen Protein-Protein-Interaktionen von nativen, sexualstadienspezifisch exprimierten Proteinen. Quelle: M.-A. Dude.
- Abb. 4.2. Schematische Darstellung aller durchgeführten Affinitätschromatographiestudien sowie der nachgewiesenen Interaktionen zwischen rekombinanten PfCCp-Domänen. Quelle: Simon *et al.*, 2009, verändert.
- Abb. 4.3. Hypothese zur Komplexbildung sexualstadienspezifischer Proteine von *P. falciparum*. Quelle: Simon *et al.*, 2009, verändert.
- Abb. 4.4. Tertiärstruktur von FP-2. Quelle: Hogg *et al.*, 2006, verändert.
- Abb. 4.5. Schematische Darstellung der vermuteten Transportwege zwischen extrazellulärem Medium und dem intraerythrozytärem Parasiten. Quelle: M.-A. Dude, nach Kirk, 2001.
- Abb. 4.6. Strukturformel des biotinylierten, nichtpeptidischen Cysteinproteaseinhibitors auf Basis von Etacrynsäure. Quelle: Dr. rer. nat. C. Gelhaus, verändert.

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 2.1. Verwendete Geräte und Anlagen mit Angabe des Herstellers.
- Tab. 2.2. Auflistung der verwendeten Einwegmaterialien mit Angaben des Herstellers.
- Tab. 2.3. Eingesetzte Puffer und Lösungen mit Angabe der Rezeptur.
- Tab. 2.4. Zusammensetzung der Medien für die *In-vitro*-Kultivierung der *Plasmodium-falciparum*-Blutstadien.
- Tab. 2.5. Zusammensetzung der Medien und Agarplatten für die Kultivierung von *E.-coli*-Kulturen.
- Tab. 2.6. Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.
- Tab. 2.7. Auflistung der verwendeten Antikörper.
- Tab. 2.8. Verwendete Proteine mit ihren zugehörigen PlamoDB-Identifizierungsnummern.
- Tab. 2.9. Getestete Inhibitoren mit ihren zugehörigen Molmassen und der Strukturformel.
- Tab. 2.10. Auflistung der in der IP verwendeten Antikörper und der eingesetzten Volumina.
- Tab. 3.1. Größe der DNA-Fragmente sowie die molekulare Masse der rekombinanten Proteine.
- Tab. 3.2. Western-Blot-Analysen der Affinitätschromatographiestudien zur Untersuchung direkter Interaktionen zwischen rekombinanten, 6His/SUMO-fusionierten PfCCp5- und PfFNPA-Proteinen mit potentiellen GST-fusionierten PfCCp-Interaktionspartnern.
- Tab. 3.3. Vergleich der IC<sub>50</sub>-Konzentration der an *P.-falciparum*-3D7-Blutkulturen getesteten Etacrynsäurederivate mit den zugehörigen Standardabweichungen.
- Tab. 3.4. Vergleich der IC<sub>50</sub>-Konzentration der an *P.-falciparum*-3D7-Blutkulturen getesteten Peptidomimetika mit den zugehörigen Standardabweichungen.
- Tab. 4.1. Übersicht der Expression ausgewählter sexualstadienspezifischer Adhäsionsproteine in sieben verschiedenen KO-Parasitenstämmen.
- Tab. 4.2. Vergleich der IC<sub>50</sub>-Konzentration [μM] der an *P.-falciparum*-3D7-Blutkulturen getesteten Peptidomimetika mit den  $k_{2nd}$ -Werten [ $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ] von rekombinant exprimiertem FP-2, CB und CL.
- Tab. 4.3. Vergleich der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen [μM] der an *P.-falciparum*-3D7-Blutkulturen getesteten Etacrynsäurederivate mit den IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von rekombinant exprimiertem FP-2 und FP-3.

## Gensequenz von *PfCCp5* und Lokalisation der Primer

ATGTTAAAGATAACATGTGTTGGCCTTTTTTTTTTACATCATTAAAAGTCTCTTTGTAAATACAAAAGCTC  
 CTGAAACGTCTCTTGAAAAATAACAGAGTTTAGGCAACAACATAGAAAAACATTAGATGGAAGATTATG  
TGCTGCAGCATTTCTTCATGATGATCAGACTTATACAAATTGTACTACTTCTCTATCCCCTGACGGAACA  
 AGCGGTTCCTTAAAAAATAATAAAATAAATAAATATATACATATATATATATATATTAGACCGTATCAATA  
 TTTTACATAATTTATACTTTCCATTTTAGGAAGAGAATGGTGTATGTCTGAAGTTCAATTACTAGGAAA  
AGGTTGCGCGGATTGGGATTATTGTAGGGATTTCGATAAATTATGACAAGTTAAGGTTGCATGCTAAAAAG  
 GTGTTTGAAGAAAAATCTTTAGAAGCAGACAGACTTAAGGATAGATTACATGTATTGAATAGTAGAGTAT  
 ATAGTATGTTACAAAAATATGATTCTGTGTGCGGAAAAAAGCATGAACTAATAAATTCCAGGATTGAAAA  
 GATAAATGAATGGTTAGATAAGAGTTCAGAATCTATTATGAAAATAGAAAACAATACTAATGATTTAAAT  
 TCAACAAAAAGTATTATTGATCAATTACAAATAGATATTAAGAAGAAAAATAAAAATGTGAAACAATCTG  
 AAGAAAATTGTAAGAATTTACCAGGATATGAAAATGAACCACATAGTGATGGATTA AAAAGTTTCTTATTT  
 TAATAATCTGTTTTTTGATGGTATACCTATAGAAACAAGAATTGAAAAAGATATTAATTTTTTATATAAT  
AGTAGAGGACCATTAGAAAATATATCACCTCATAAATATTCTATTTCGTTATGAAGGGTATATATTTGTTT  
 CACATAATGGGACATATACATTTACTATAGAAACAGATTGTTATATTAGATTATTGGTAAATAATAAAGT  
 TATATTAAC TTATGGTTTAGAAGAAGTTGTAGATATGACAGATGAAAATATGTATCATTATAATCAACAT  
 GATATGTATCAATATAATGATGGATATAAATTAATACACCTTTTTCTTTTTTCATATCCACAATATAGTC  
 ATATAAAATATACTTTAAATAATGATGATTTAAGTGAAATAATTA AAAAAAATTCTATACCTATAGGAATT  
GTTAGGTGGAGAAAAAAACATAAATTTGTACTAGAAATATCACATTCTGCTCATTTAAAAATATAAAAAATGAA  
 GAATCCAGTTCTTTCAAATTATATTGGAAATCCAGTAGAATTCATCAACAAATAATACAAAGTCATTATT  
 TTTTACAGAAAATATTATCCACCCACTAGATTCTCTTCTTTAGATCCTGATATATTTGAACTTGGATT  
 AGTAGATATAAATCAACAAGTGTATAAAAATAATAAATTGGATTATAACAAATGTTAATACAAAGTAT  
 GTAGGTTTACATCTTTTAAAAACACAAGAACATCCTACATATAATAAATTCTCTCTATCTATTAATACAG  
 CATCAAATTTATTTATCGCTTCGCCTATAGATAATGTATTTCCATTAAGTCCCTACAAAGATTCTTTGTG  
 GAAAGTATTCGATACGGGTGATATTATAGAAATAGAAAATAAAGGTAATAGTAATAATAATAATAATA  
 ATCTATAAAAAGAAACAGTTTAAATAAAAATTCATTCTTTAAAAAATAAATCAGAATTA AAAATTTTATA  
 TATCAAATAATATCCCTTCTTTATTTTTGCTCAACAAAGAAAAATATTTCCAACGATATGTAATGGGGA  
 ACAACAAATTTTGTATCACCTTCTAATGCTGTATTTAAAGAATGTGAAGAATCATCTTCTTTATCTAAA  
 GAATTTAATTGCATAGCTGGATTAAGTTCTTTGCATATGGATAAAAAATTTTCATGTATGGAGATCATTAA  
 ATTCAGGTATTGGAGAATATATTAAGTTTCTTTTAATACACCAGTACAAATTAATAAATTTAGATTTAA  
 ACCAAGAGATGATGTTTAAACATGGCCATCAGAAATATCATTACTATTTGATGATACCGAAATTATCATC  
 CCAATTTTACATACATCTAATATTGAACATAATACAACCAACTAGAACATCCAATTATAACAACATTTG  
 TCAAAATAGAAATTAAGATATGTTTCTTAATCATAATGAAACAGGAGGTTCTTTTGAACTTATTGGGAA  
 TTCTTGTAATCTTACTAATGATGATTATTTAACTCATCATGGTGCTACTATAGATATTAATGATTGTCAT  
 AATAACTTTTAAACAATATACCTGATGTTCTTCCGTTAATACATGGAGATAAAATTTTTAATAACATGTG  
 ATCCAAATGTTT TAGACAAC TTATCTGGAGAAGTATATGGTTCCAGATGTATATTCTATAGATTTCATCTAT  
 ATGTAAAGGCTTCTATTTCATGCAGGTGTTTGTAAATATCCAAAATAAACATAATTGTAAATTTTTAATTATA  
 ATCAATGAAAAACAAAAAATTATATAGGTACTTTACAAAATCGTATTTTGTCTTTAAATCAAAGTAATA  
 ATTCAAATTTATCTTTTACATTTTCTCCAATAATTAATCCAAACTTTTTCTCAATTTTATTTCATCATATCC  
AAATAGTTATTCCATTGTATTTAAAGAAATGATGATCTTAATTTACCAAATAAGTTTTTAATAGATTAT  
 GGAGATGTTTTTAATAATTATGGATCTTTTGCTTACGGATGGAATAAACCAATTACTTTTTTAAACTCTT

CATCACAAAAAAAAAATCTTATTCTAATGGTCTCTATTTCAGGAGGTATACCATTTCCCCCTGCAACAGC  
 TAGTCAACATTGTATTACCGATTTAGAATGCCAAACGAATTTCTGGACTTTCCAAACTCATGAAAATGGT  
 ACATATACTATTCAAGTACTTGTGGAAATCTTTCATCCGATATTAACAAAATACATTTATTGAAGTAA  
 ACGGATTGCCTTTAATCAAAAATATACAACCTCGAAAAAATGAATATTTTGTTCAGTTAAAAATGTTCA  
 CGTTACAAGTAGGTCTTTGATATTTACATCGACATGTTTGGAAACAGACAACGAATGTGCTAACGCAAAA  
 ACGACAATAATGGCACTTCAAATATTGAAAATTTAAATTTAACAAAAAATGAAAAGAAAAAGATATACC  
 CCAATATATATATATATATATATTTATAACATATTACACCAACGTCATATAGAATAACAAATTAACATTTTT  
 AAAAGGAAATATGCTC

**Verwendete Primer zur Herstellung der PfCCp5-KO- und -Comp-Konstrukte:**

*PfCCp5 wt1 Sense* 5'-AGATTATGTGCTGCAGCA-3'

*PfCCp5 wt1 Antisense* 5'-GAATTGTTAGGTGGAGAA-3'

*PfCCp5 wt2 Sense* 5'-GCTTCTATTCATGCAGGT-3'

*PfCCp5 3'UTR wt2 Antisense* 5'-CACCAACGTCATATAGAA-3'

*PfCCp5 KO1 Sense Sac II/ PfCCp5 KO BSD-1 Sense BamH I* 5'-GGTTCGCGCGATTGGGAT-3'

*PfCCp5 KO1 Antisense Not I/ PfCCp5 KO BSD-1 Antisense Not I* 5'-AGTAGAGGACCATTAGAA-3'

*PfCCp5 Comp1 Sense Pst I* 5'-CTCCAATAATTAATCCAAACT-3'

*PfCCp5 Comp2 Sense Pst I* 5'-CAAATAGTTATTCCATTGTA-3'

*PfCCp5 Comp2 Antisense BamH I* 5'-GGCACTTCAAATATTGAAA-3'

## Gensequenz von *PfFNPA* und Lokalisation der Primer

ATGACACTAGAACATATAAGACAAAAAAGGAGAACATAATAATGAAGTTTATGAAAAGTACATGTATAT  
 GTAACCATTTATAATAGTTCTAAATATTTGTACCTACCTACATATATATAAATATATATATATATTTTTTTTT  
 TTTTTTTGTATATAGAAACTGACGGAATATCGACAACAACATAGGAAAACCGTGGATGGGCGTCTATGTG  
 CAGCAGCCTTTGTTCAAGACGATCAAACATATACAGACTGCACTAGGGCAACAGATCCTAATGGTATAAC  
 GGGAAAGGAATGGTGCATGTGGAGGTTCAATTAATAGGAAAAGGAAATAGAGATTGGGATTATTGCAAA  
 GGAGTAATTAATTATGATGTTGTACGAAGTAAGGCACGTACTTTTTTCCAATCTAAATCCAATGAACTTC  
 TTGATGCTGTAAACAAATTAGATTTTGAATACAAAAATTAGTTGGTATATATGAAAAATATAAAGAAGT  
ATGTGGTAATGCATCCGATTTGTTAAAAAATAATTCAAGATATTAATGATTTAGCAAAAAATTCAGT  
 CGTAACATTAATAGATTATTATTACAAGCAACATCTCTAAGTGATACTGGAAATAAAATAATTGAACTAG  
 AAGAGGAGGTAGAAAAAATAGAAAATCATATCTTGAAAATAAAAAGAACTGTTCTATGCAGAAAGGTTA  
 TGTGTTGAAGAAAAGCTGATGGATTAATGGCTAGTTATTATAATAATGCTTATTTTTCTGGTTATCCT  
 ACAGCCATACATAATGATAAATATATAAACTTTATATGGGACACAGGGATACCAATAGAAAATATTCCCTT  
 ACCAACATTTTTCAATTAGATGGGATGGATATTTAAAAATCCCTGAATCAGATAATTACATTTTTCTCAGT  
AGATCATGATTGCGGGATAAGAATATTTTTAGATAATTCTCCTATAATTGTAGACAATATGCCTTTTTCCA  
 AAAGAAGAAGAATCAGAAGAAATAAGACCTATATCTATTCAATCATTGATAAAAATGAATTCCAAAGTGC  
 ATAAAACAAATTCAGAAAAGTTAGGATTAATAGGTGGAAAGAAATATAAAATAAGAATTGAATATTTTTCA  
 TTTGAGTACTATGAAATTTGCAAATCCACACATATCCCATATTATATTATACTGGAAGTCAAATAATATT  
 ATGGAAGAAATAATACCATCAAATATTTTTTTTCAAGGTAATGTATCTACGCCTTTAAGAATAACGGAAT  
 TAAATGGAGATACATTTGAAATTTTTCCATTACAAAATGGGGTACATGCATTTATGAAATAATATGAGTTA  
 TTTAATTAATGACATACCTACAATACATGAAAAATTTAAAAGCAATTAGAACTCTTTATAATTTAATAAAA  
 AATATAATCAAATTTAGGATAAATGTATATTGTATTGTTTATATAGCTATACCAAAAAGAACAAAAAAGA  
 ATATCCCTTTAAATGATATTACTAAAAAGAGTTTACAAACACTAAAGAAACGTTATCCATATATGAAGT  
 ACAACAAAATTCAAATAACAGTTCAACGGAACAAAAGATATATTATATATATTCTTCACAATATAATGAA  
 GGAGAGGTTATTATATCTCTACCTACTCTACAACATTTTTACTCTTTGTACAACCGAGTGATTTACGAT  
 CAGGTGATACATGTAAGGTTATGTACAACCAGTTTCTCTAACTAGTTCCGATTATTTCCATTCATGTTA  
 CACCTCTTCTTATGAATCCCAAATGTTTGATTGTAACGCTGGATTTCAGTGGTAATAACCAAGAAAAAGAA  
 TATTCAACATGGAAAACGACAAAATAAATCACTGGGTCAATACGTAAGTATAAATTTAAGTATGACA  
 TAGACATACACTCTTTTACGTTTAAAACATTGAATTTATCTAATAATAATACAATCAATGAATTATCTTT  
 ATATTTTCCAAGCATAAAAAACCCAGAAATATTTTCTATATCTCCTGGGCATCATCATTATGTCTTAAA  
 ACTCCAATAAAGACCAATACGGTAAAAGTTGTAATTTCCAAAGTAAATAATCCCAAAGCTCAAACAGGTG  
 GTAATATAACATTTTATGGTATACCTTGTATAGATATAAAAAATCAAGAAAAAGAATCAGACAAAAAAA  
 AAGTCAATATGAAATTAATATTTTTTTTAGAAGCAAAAATGTACATATTTCTAAACCATTCAATTGGATA  
 ATAGATAATGGAATGAAAAATCAGATCATGGATTTTTCAAATACGGATGGGATTTATTACCTACACCAA  
 TTGATTTGAGATATTTAGATAAAAAAGATCCTACACATGCAGGAATTTGTTTTGTCCCATATGAATGTAA  
 TAACACTAATACATGTAATAAGCAAACATTTAATAAATGGTCCATAGATCTTATACATGAAGGAACATAT  
 TCTGTTACTATAGAAATAGGATCTCCTACGGCAAACAAGAAATTAATTCAATTAAGTTAATAATGAAA  
 TTTTTATAAATAATATTTTTCTTAAACCTAAACAATATACTAAAGTAACTGCTAACATTGTTATCAAGGA  
 AAATAAGACATTGGAACCTACAATAACAAATACGGTAATACAATCTATACAGATATTATTCCTTCAT  
AACTAAACAATATACTAAAGTAACTGCTAACATTGTTATCAAGGAAAATAAGACATTGGAACCTTACAAC  
 AATACAAATACAATACAATCTATACAGATATTATTCCTTCATAACTAACAAAATGAAATAAAAAA

AATAATGAAAAAGGATATTTAAATGGTAAATCCATGTGTAGAACAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAATAAA  
TAA

**Verwendete Primer zur Herstellung der PflNPA-KO- und-Comp-Konstrukte:**

PflNPA wt1 Sense 5'-ACTAGGGCAACAGATCCT-3'

PflNPA wt2 Sense 5'-ACTGACGGAATATCGACA-3'

PflNPA wt3 Sense 5'-TGTACCTACCTACATATA-3'

PflNPA wt4 Sense 5'-GGTAATGTATCTACGCCT-3'

PflNPA wt5 Sense 5'-CCCAAAGCTCAAACAGGT-3'

PflNPA wt1 Antisense 5'-GCAAATCCACACATATCC-3'

PflNPA wt2 Antisense 5'-CTCCTGGGCATCATCATT-3'

PflNPA 3'UTR wt3 Antisense 5'-GGTAAATCCATGTGTAGA-3'

PflNPA KO1 Sense Sac II/PflNPA BSD KO1 Sense BamH I 5'-GTACGAAGTAAGGCACGT-3'

PflNPA KO1 Antisense Not I/PflNPA BSD KO1 Antisense Not I 5'-GTAGATCATGATTGCCGGG-3'

PflNPA KO2 Sense Sac II 5'-ACCGTGGATGGGCGTCTA-3'

PflNPA KO3 Antisense Not I 5'-TGTGGTAATGCATCCGAT-3'

PflNPA KO4 Antisense Not I 5'-CAAGCAACATCTCTAAGTG-3'

PflNPA BSD KO2 Sense BamH I 5'-GGGTACATGCATTTATG-3'

PflNPA BSD KO2 Antisense Not I 5'-AATCACTGGGTCAATACG-3'

PflNPA Comp Sense Pst I 5'-GGTATACCTTGTATAGAT-3'

PflNPA Comp Antisense BamH I 5'-CAGATATTATTCCTTCATAAC-3'

## Einzelwerte der Viabilitätstests

Substanzbezeichnung	Messung Nr. 1*	Messung Nr. 2*	Messung Nr. 3*	Messung Nr. 4*
P-1a	0,03167	0,07916	-	-
P-1b	0,009106	0,009	-	-
P-1c	0,01229	0,01464	-	-
P-1d	0,0618	0,0573	-	-
P-2a	0,009733	0,02282	0,02587	0,01388
P-2b	0,04261	0,07046	-	-
P-2c	0,1055	0,02309	-	-
P-2d	0,3193	-	-	-
P-2e	1,882	9,799	16,43	-

\*IC<sub>50</sub>-Konzentration [ $\mu$ M]

Substanzbezeichnung	Messung Nr. 1*	Messung Nr. 2*	Messung Nr. 3*
E-1	0,085420	0,01975	0,1342
E-2	0,1804	0,06932	-
E-3	0,088220	0,04452	-
E-4	0,19870	0,11060	-
E-5	0,13770	0,14430	-
E-6	0,016850	-	-
E-7	k. l.	k. l.	
E-8	0,12100	0,11580	-

\*IC<sub>50</sub>-Konzentration [ $\mu$ M]

## Curriculum Vitae



Marie-Adrienne Dude

### Persönliche Angaben

---

Geboren am 5. Februar 1978, in Dresden

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

---

#### **Seit 02/2005 Promotion**

Zentrum für Infektionsforschung, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Laborleiterin: Dr. phil. nat. Gabriele Pradel

Ø Promotionsthema: *„Identifizierung neuartiger Zielstrukturen für die Wirkstoffentwicklung sowie als Vakzinenkandidaten zur Therapie von Malaria.“*

#### **05/2004 - 01/2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin**

Pathologisches Institut, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Laborleiter: PD Dr. med. Andreas Rosenwald

Ø Forschung: Erstellung von Genexpressionsprofilen von follikulären und transformierten follikulären Lymphomen.

#### **10/1997 - 03/2004 Studium der Biologie, Abschluss mit Diplom**

Universität Hohenheim

Prüfungsfächer: Zoologie (Schwerpunkt: Zell- und Neurobiologie), Virologie, Biophysik

Zusatzfach: Parasitologie

#### Note: sehr gut (1,0)

Ø Diplomarbeit (Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Kimmig, Abteilung Molekulare Parasitologie des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg):  
*„Untersuchungen zur Epidemiologie von Coltiviren in Baden-Württemberg.“*

#### **07/1997 Abitur**

Zeppelin-Gymnasium Stuttgart

### **Extracurriculäre Fächer**

Teilnahme an der Vorlesung „Personalpolitik und Organisationspsychologie“ (mit Prüfung, bestanden) sowie an der Vorlesung „Personal und Arbeit“ aus dem Studienfach Wirtschaftswissenschaften der Universität Hohenheim.

### **Studienbegleitende Tätigkeiten**

10/1999 - 12/2003 Mitglied der Fachschaft Biologie  
10/2001 - 09/2002 Mitglied in der Studienkommission Biologie  
10/2001 - 09/2002 Mitglied im Prüfungsausschuss Biologie  
04/2002 - 09/2002 Mitglied im Fakultätsrat

### **Sprachen**

---

**Englisch:** Fließend, in Wort und Schrift

**Französisch:** Gut, in Wort und Schrift

**Italienisch:** Gut, in Wort und Schrift

**Spanisch:** Grundkenntnisse

### **Computerkenntnisse**

---

**Microsoft Office:** Power Point, Word, Excel

**Adobe<sup>®</sup> Anwendungsprogramme:** Acrobat Reader, Acrobat Distiller, Adobe Photoshop

**Statistikprogramme:** GraphPad Prism, u.a.

### **Lehrtätigkeiten**

---

#### **Studentische Hilfskraft**

09/1999 – 09/2002 Lehrstuhl für Zoologie, Fachgebiet Neuro- und Entwicklungsbiologie sowie im Fachgebiet Parasitologie, Universität Hohenheim

#### **Betreuung von Studierenden**

Seit 05/2005 Betreuung von Biologiestudenten im Grund- und Hauptstudium am Zentrum für Infektionsforschung der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

### **Auszeichnungen und Preise**

---

#### **12/2003 Diplom mit Auszeichnung**

Universität Hohenheim

**12/2003 Auszeichnung der Diplomarbeit**

Preisgeld in Höhe von 1000 DM gestiftet von der Firma Baxter Deutschland GmbH

**12/2005 Reisekostenzuschuss**

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

**10/2006 Eingeladener Vortrag**

4. Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Malaria der Paul-Ehrlich-Gesellschaft, Würzburg.

## Publikationen und Konferenzbeiträge

### Internationale Journals

- Scholz, S. M., Simon, N., Lavazec C., **Dude, M.-A.**, Templeton, T. J., Pradel, G. (2007). *PfCCp* proteins of *Plasmodium falciparum*: gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *Int. Journal Parasitol.*, 38(3-4): 327-40.
- Ettari, R., Nizi, E., Di Francesco M. E., **Dude, M.-A.**, Pradel, G., Vičik, R., Schirmeister, T., Micle, N., Grasso, S., Zappalà, M. (2007). Development of peptido-mimetics with a vinyl sulfone warhead as irreversible falcipain-2 inhibitors. *J. Med. Chem.*, 51 (4): 988-96.
- Simon, N., Scholz, S. M., Moreira, C., Templeton, T. J., Kühn, A., **Dude, M.-A.**, Pradel, G. (2009). Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, 284 (21):14537-46.
- Dude, M.-A.**, Kaeppeler, U., Herb, M., Schiller, M., Schulz, F., Vedder, B., Heppner, S., Pradel, G., Jiri, G., Rosenthal, P. J., Schirmeister, T., Leippe, M., Gelhaus, C. (2008). Synthesis and evaluation of non-peptidic cysteine protease inhibitors of *Plasmodium falciparum* derived from etacrynic acid. *Molecules*, 4(1):19-35.

### Reviews

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

### Konferenzbeiträge

- Dude, M.-A.**, Templeton, T. J., Pradel, G. (2006). Role of the LCCL multi-domain adhesion protein family members *PfCCp5* and *PfFNPA* during the *Plasmodium falciparum* life cycle. 22<sup>nd</sup> Meeting of the German Society of Parasitology, Vienna.
- Dude, M.-A.**, Wagner, C., Weiß, S., Simon, N., Pradel, G. (2006). In search for new drug targets in malaria therapy. SFB 630 1st International Symposium „Novel Agents against Infectious Diseases“, Würzburg.
- Scholz, S. M., **Dude, M.-A.**, Lavazec, C., Simon, N., Templeton, T. J., Pradel, G. (2006). Evaluation of the *PfCCp* multi-domain adhesion proteins as candidates for transmission blocking vaccines. Molecular Parasitology Meeting XVII, Woodshole.
- Scholz, S. M., Wagner, C., **Dude, M.-A.**, Abreu, A., Frank, R., Templeton, T. J., Pradel, G. (2006). The *PfCCp* multi-domain adhesion proteins form a complex

- during gametogenesis of *Plasmodium falciparum*. Molecular Parasitology Meeting XVII, Woodshole.
- Scholz, S. M., **Dude, M.-A.**, Wagner, C., Templeton, T. J., Pradel, G. (2006). *PfCCp* multi-adhesion domain proteins are essential for malaria transmission to the mosquito. 58<sup>th</sup> Meeting of the German Society of Hygiene and Microbiology, Würzburg, *Int. J. Med. Microbiol.* 296 (Sppl. 3).
- Dude, M.-A.**, Barthel, D., Pradel, G. (2006). In search for novel agents in malaria therapy. 58<sup>th</sup> Meeting of the German Society of Hygiene and Microbiology, Würzburg, *Int. J. Med. Microbiol.* 296 (Suppl. 3).
- Dude, M.-A.**, Barthel, D., Pradel, G. (2006). In search for novel agents in malaria therapy. 2<sup>nd</sup> Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB544 (Heidelberg) and SFB630 (Würzburg) „New Trends in Infectious Disease Research“, Heidelberg.
- Dude, M.-A.**, Barthel, D., Pradel, G. (2007). In search for novel agents in malaria therapy. Young Investigator Meeting, Würzburg.
- Dude M.-A.**, Sologub L., Barthel D., Schirmeister T., Holzgrabe U., Bringmann G., Pradel, G. (2007). Characterization of novel compounds for the treatment of malaria. 3<sup>rd</sup> Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB544 (Heidelberg) and SFB630 (Würzburg) „New Trends in Infectious Disease Research“, Würzburg.
- Scholz, S. M., **Dude, M.-A.**, Lavazec, C., Simon, N., Templeton T. J., Pradel, G. (2007). Evaluation of the *PfCCp* multi-domain adhesion proteins as candidates for transmission blocking vaccines. Young Investigator Meeting, Würzburg.
- Scholz, S. M., Simon, N., Frank, R., **Dude, M.-A.**, Abreu, A., Templeton T. J., Pradel, G. (2007). Molecular interactions of *PfCCp* multi-domain adhesion proteins during gametogenesis in *Plasmodium falciparum*. 5. Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Malaria der Paul-Ehrlich-Gesellschaft, Würzburg.
- Scholz, S. M., Simon, N., **Dude, M.-A.**, Frank, R., Kühn, A., Moreira, C., Abreu, A., Templeton T. J., Pradel, G. (2008). Molecular interactions of sexual stage adhesion proteins during gametogenesis of *Plasmodium falciparum*. 23. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg.
- Simon, N., Kühn, A., Scholz, S. M., Rupp, I., **Dude, M.-A.**, Moreira, C., Alano, P., Williamson, K. C., Templeton, T. J., Pradel, G. (2008). Molecular interactions of sexual stage-specific adhesion proteins in *Plasmodium falciparum*. 23. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg