



Die Gametogenese des humanpathogenen Malariaerregers *Plasmodium falciparum* -
eine Charakterisierung von daran beteiligten Proteasen sowie die Beschreibung
und Funktionsanalyse von dabei auftretenden interzellulären Gametenfilamenten

Gametogenesis of the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum* -
the characterization of involved proteases and a description and functional analysis of
gamete intercellular filaments

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität

vorgelegt von

Ingrid Rupp

aus

Wolfratshausen

Würzburg 2009

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Schultz

1. Betreuer: Frau PD Dr. G. Pradel

2. Betreuer: Herr Prof. Dr. G. Krohne

3. Betreuer: Herr Prof. Dr. Drs. h.c. J. Hacker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Gemäß § 12 Abs. 2 Satz 2 Nr. 4 und 5 der Ordnung für Promotionsverfahren an den Graduiertenschulen der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. Mai 2006; geändert durch Ordnung vom 23. Oktober 2006 und geändert durch Ordnung vom 9. April 2009.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

Die Gametogenese des humanpathogenen Malariaerregers *Plasmodium falciparum* -
eine Charakterisierung von daran beteiligten Proteasen sowie die Beschreibung
und Funktionsanalyse von dabei auftretenden interzellulären Gametenfilamenten

Gametogenesis of the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum* -
the characterization of involved proteases and a description and functional analysis of
gamete intercellular filaments

eigenständig und selbstständig ohne die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt habe. Ich habe keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in einer ähnlichen Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich versichere weiterhin, dass ich außer dem Titel 'Diplom-Biologin Univ.' keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Heidelberg, November 2009

(Ingrid Rupp)

Danksagung

Ich möchte folgenden Personen danken, die am Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beteiligt gewesen sind:

Frau PD Dr. G. Pradel für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit, eine fruchtbare Projektvergabe, die finanzielle Unterstützung auch während der schriftlichen Arbeiten der vorliegenden Dissertation, sowie die Ermöglichung und Ermutigung während eines Gastaufenthaltes in den USA und durch die Teilnahme an zahlreichen Konferenzen meinen Horizont in der wissenschaftlichen Forschung zu erweitern.

Herrn Prof. Dr. G. Krohne für die herzliche und motivierende Begleitung als Zweitbetreuer dieser Doktorarbeit und zusammen mit seinen Mitarbeiterinnen für Rat und Tat in Sachen Elektronenmikroskopie.

Herrn Prof. Dr. Drs. h.c. J. Hacker für die freundliche und unterstützende Begleitung als Drittbetreuer dieser Doktorarbeit sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes als ehemaliger Leiter des Zentrums für Infektionsforschung an der Universität Würzburg.

Herrn Prof. Dr. M. Frosch als kommissarischem Leiter des Zentrums für Infektionsforschung an der Universität Würzburg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Frau Prof. Dr. K.C. Williamson für die Ermöglichung eines arbeits-, lehr- und eindrucksvollen dreimonatigen Forschungsaufenthaltes in ihrem Labor an der Loyola Universität in Chicago.

Frau Prof. Dr. T. Schirmeister für eine erfolgreiche Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft.

Frau L. Sologub und Frau Dipl.-Biol. R. Schillig (geb. Bosse) für die Unterstützung und Mitarbeit an einigen der in dieser Arbeit dargestellten Experimenten sowie für sehr viel Spaß und Unterhaltung in Inkubationspausen.

Herrn Dr. J. Przyborski für die Transfektion der Plasmepsin 6- und Metacaspase 2-Konstrukte.

Allen ehemaligen Laborkollegen für eine herzliche Arbeitsatmosphäre und Freude im musikuntermalten Arbeitsalltag, dabei vor allem: Nina Simon, Andrea Kühn und Shruti Agarwal sowie aus dem Team Williamson Saliha Eksi und Beata Czesny. Zusätzlich möchte ich mich bei Roland Frank, Andrea Kühn, Florian Kohlhepp, Nina Simon, Gesa Richter, Jasmin Bartl, Matthew Lewis und Monty Cross für die sorgfältige Korrektur dieser Dissertation bedanken.

Den unzähligen hilfsbereiten Mitarbeitern der Universität Würzburg, die mir weitergeholfen haben, wenn ich etwas borgen, ausprobieren oder lernen wollte, dabei vor allem Hilde Merkert.

Dem Sonderforschungsbereich 479, Deutschen Akademischen Austausch Dienst, und der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie für finanzielle Unterstützung.

Frau U. von der Leyen für die Einführung des Elterngeldes und den Ausbau der Krippenbetreuungsplätze.

Unserer gesamten Familie inklusive aller Eltern und Großeltern, sowie meinen Freunden für ihre Unterstützung- dabei gebührt vor allem meiner Mutter enormer Dank, ohne die diese Dissertation womöglich nicht mehr geschrieben worden wäre.

Roland für ...so einiges, und noch viel mehr.

Und Johann, dafür das er in aller Gemütsruhe mitgemacht hat, was ich geplant habe.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Tropenkrankheit Malaria	1
1.1.1 Verbreitung	1
1.1.2 Krankheitsbild	2
1.2 Der Malariaerreger <i>Plasmodium falciparum</i>	2
1.2.1 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	3
1.2.2 Morphologie	6
1.2.3 Sexualstadienspezifische Proteine	8
1.3 Kontrollstrategien	10
1.3.1 Impfstoffforschung	10
1.3.2 Medikamentenentwicklung	12
1.4 Die Rolle von Proteasen im Lebenszyklus der Malariaerreger	13
1.4.1 Proteasen bei <i>Plasmodium</i> und ihre Wirkungen	13
1.4.2 Die Anwendung von Protease-Inhibitoren in der Malariaforschung	16
1.4.3 Der Hintergrund der ausgewählten Proteasen	17
1.5 Neuartige Zell-Zellverbindungen in Eukaryoten	21
1.5.1 Signalübertragungsarten in mehrzelligen Organismen	21
1.5.2 Neuartig beschriebene Zell-Zellverbindungen	22
1.6 Das Ziel der Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Geräte	28
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.3 Laborkits, Enzyme, Größenstandards	30
2.1.4 Puffer und Lösungen	31
2.1.5 Medien	33
2.1.6 Zelllinien, Bakterienstämme und Stechmücken	34
2.1.7 Plasmide	35
2.1.8 Oligonukleotide	37

2.1.9 DNA-und Proteingrößenstandard.....	38
2.1.10 Protease-und Zytoskelett-Inhibitoren	38
2.1.11 Antikörper	40
2.1.12 Genidentifizierungsnummern	42
2.1.13 Angewandte Computerprogramme	42
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Zellbiologische Methoden	43
2.2.1.1 Desinfizieren und Sterilisieren	43
2.2.1.2 Die Kultivierung und Konservierung von Bakterien	44
2.2.1.3 Die Herstellung kompetenter Bakterien	44
2.2.1.4 Die Transformation kompetenter Bakterienstämme	45
2.2.1.5 Die Kultivierung und Konservierung von <i>P. falciparum</i>	45
2.2.1.6 Dünner Blutausschlag und Parasitämiebestimmung.....	47
2.2.1.7 Die Herstellung von Gen- <i>knockout</i> -Parasiten	477
2.2.1.8 Die Klonale Selektion von KO-Parasiten.....	50
2.2.1.9 Der Exflagellationstest.....	51
2.2.1.10 Der Exflagellationsinhibitionsassay.....	51
2.2.1.11 Die LysoTracker-Färbung von <i>P. falciparum</i>	52
2.2.1.12 Die Aufreinigung von Parasitenstadien	53
2.2.1.13 Die Bestimmung der Zelldichte mittels Neubauer-Zählkammer.....	54
2.2.1.14 Indirekte Immunfluoreszenzstudien	55
2.2.1.15 Rasterelektronenmikroskopische Studien.....	56
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	58
2.2.2.1 Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	58
2.2.2.2 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	58
2.2.2.3 Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten.....	60
2.2.2.4 Der DNA-Verdau	61
2.2.2.5 Die Agarose-Gelelektrophorese.....	62
2.2.2.6 Die Elution von DNA aus Agarosegelen	62
2.2.2.7 Die Ligation von DNA-Fragmenten.....	62

2.2.2.8 Die Plasmidisolierung aus Bakterien	63
2.2.2.9 Die Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	64
2.2.2.10 Die Isolation von RNA und Herstellung von cDNA.....	65
2.2.2.11 Die Isolation genomischer DNA aus <i>P. falciparum</i>	66
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	67
2.2.3.1 Die Expression rekombinanter Proteine.....	67
2.2.3.2 Die Aufreinigung rekombinanter Proteine	69
2.2.3.3 Die Vorbereitung von Proteinproben für Western-Blot-Studien.....	70
2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	71
2.2.3.5 Die Bestimmung der Proteinkonzentration.....	72
2.2.3.6 Die Gewinnung von Immunsereen.....	72
2.2.3.7 Die Western-Blot-Analyse.....	73
3 Ergebnisse	75
3.1 Die Rolle von Proteasen während der Gametogenese von <i>P. falciparum</i>	75
3.1.1 Studien unter Verwendung von Protease-Inhibitoren.....	75
3.1.1.1 Die Wirkung von Protease-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation	75
3.1.1.2 Lokalisation der Zielmoleküle des Protease-Inhibitors bADA im Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	79
3.1.2 Die Charakterisierung ausgewählter Proteasen	81
3.1.2.1. Transkriptionsstudien	81
3.1.2.2 Die Herstellung von Gen- <i>knockout</i> -Parasiten	82
3.1.2.3 Die Herstellung rekombinanter Proteine und die Gewinnung von Immunsereum	86
3.1.2.4 Proteinexpressionsanalysen und Lokalisationsstudien von <i>PfSub3</i>	89
3.2 Die Charakterisierung neuartiger Gametenfilamente während der Gametogenese von <i>P. falciparum</i>	95
3.2.1 Die Rolle von sexualstadienspezifischen Proteinen bei der Bildung neuartiger Gametenfilamente.....	95
3.2.2 Der Zeitpunkt der Filamentbildung und Evaluierung der Filamentlänge	98
3.2.3 Die Charakterisierung der Filamentmembran.....	100

3.2.4 Die Rolle des Zytoskeletts in der Gametenfilamententwicklung	102
3.2.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Filamentmorphologie	105
3.2.6 <i>Live-imaging</i> -Analysen der Zellfilamente	106
3.2.7 Gametenfilamente im natürlichen System.....	109
4 Diskussion.....	111
4.1 Proteasen bei <i>P. falciparum</i> und ihre Bedeutung in der Malariaforschung.....	111
4.1.1 Eine Zuteilung möglicher Wirkungsweisen von an der Sexualentwicklung von <i>P. falciparum</i> beteiligten Proteasen verschiedener Kategorien und das Potential von Studien unter Einsatz von Protease-Inhibitoren	112
4.1.1.1 Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren	113
4.1.1.2 Cysteinprotease-Inhibitoren.....	118
4.1.1.3 Metalloprotease-Inhibitoren	123
4.1.1.4 Aspartatprotease-Inhibitoren	125
4.1.2 Erkenntnisse über ausgewählte sexualstadienspezifische Proteasen.....	127
4.1.2.1 Die transkriptionelle Aktivität der Proteasengenloci	127
4.1.2.2 Der Versuch der Generierung von <i>knockout</i> -Parasiten und dessen Aussagekraft über die Proteasen	128
4.1.2.3 Eine nähere Betrachtung der Expression der Subtilase <i>PfSub3</i>	134
4.2 Auf dem Weg zur vollständigen Aufklärung der Sexualentwicklung von <i>P. falciparum</i> – die Bedeutung von neuartigen Zell-Zellverbindungen	142
4.2.1 Die Beteiligung sexualstadienspezifischer Proteine an der Filamentbildung .	142
4.2.2 Die Filamentmorphologie - Variationen eines neuen Phänomens.....	145
4.2.3 Die Biogenese: die Filamente als Ausläufer der parasitären (Gameten-) Plasmamembran	148
4.2.4 Die Evaluation von an der Filamentbildung beteiligten Zytoskelettkomponenten unter Einsatz von Inhibitoren.....	151
4.2.5 Von der Untersuchung lebender Gameten zu der Formulierung einer möglichen Funktion der Gametenfilamente	155
5 Zusammenfassung.....	158
Summary.....	161

Inhaltsverzeichnis

6 Ausblick.....	164
7 Anhang.....	166
Ergänzende Angaben	166
Abbildungsverzeichnis	172
Tabellenverzeichnis	175
Abkürzungen und Einheiten.....	177
Curriculum vitae.....	181
Publikationen und Tagungsbeiträge.....	184
Literaturverzeichnis.....	186

1. Einleitung

1.1 Die Tropenkrankheit Malaria

1.1.1 Verbreitung

Malaria ist die bedeutsamste Tropenkrankheit der Welt mit über einer Millionen Todesfällen pro Jahr. Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) gibt an, dass 3,3 Milliarden Menschen 2006 in Gefahr lebten, an Malaria zu erkranken und 247 Millionen Fälle an Malariaerkrankungen weltweit auftraten (2008). Neben HIV und Tuberkulose ist Malaria zudem eine der bedeutsamsten Infektionskrankheiten weltweit. Kinder unter fünf Jahren und schwangere Frauen sind dem Risiko einer Malariaerkrankung tödlich zu erliegen am stärksten ausgesetzt (Snow & Omumbo, 2006). Dies spiegelt sich in der Tatsache wider, dass jede 30 Sekunden ein Kind an Malaria stirbt (WHO, 2009). Malariarisikogebiete sind weltweit tropische und subtropische Gegenden (Abbildung 1.1), wobei die höchste Übertragungsrate mit über 90 % der Malariaerkrankten in Afrika südlich der Sahara vorkommt. Über die Hälfte der Weltbevölkerung lebt in Malariarisikogebieten (Bremam *et al.*, 2004).

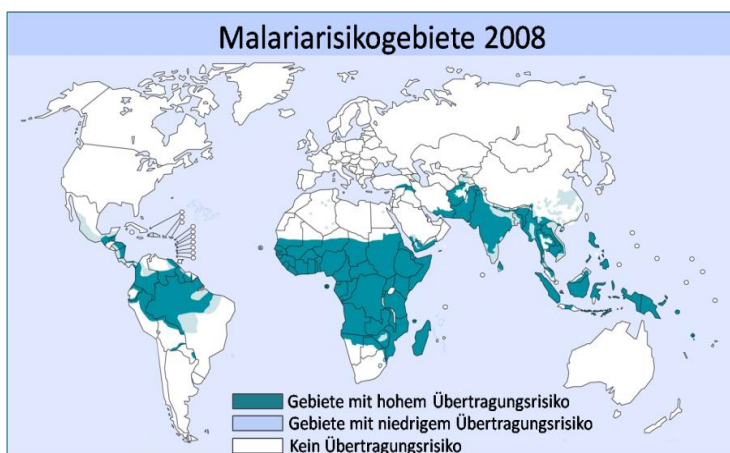


Abbildung 1.1. Weltweite Malariarisikogebiete. Malaria tritt in tropischen und subtropischen Gegenden mit der höchsten Übertragungsrate südlich der Sahara in Afrika auf. Über die Hälfte der Weltbevölkerung lebt in Malariarisikogebieten. Jährlich erkranken über eine Millionen Menschen an der Malaria tödlich.¹

Der Erreger der Malaria ist ein einzelliger Parasit der Gattung *Plasmodium*. Bisher galten die vier Plasmodienspezies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* als die einzigen für den Menschen gefährlichen Malariaerreger, wobei mittlerweile *P. knowlesi* ebenfalls als fünfter humanpathogener Malariaerreger in Südostasien an Bedeutung gewinnt (Cox-Singh & Singh, 2008; White, 2008). Als wichtigstes endemisches Verbreitungsgebiet von *P. falciparum* gilt Afrika, wo über die Hälfte der Bevölkerung in Gebieten mit hohem Malariaübertragungsrisiko lebt (Hay *et al.*, 2009). Darüber hinaus kommt *P. falciparum* auch in Asien sowie Mittel- und Südamerika endemisch vor. *P. vivax* ist hauptsächlich im mittleren Osten, Asien, im westlichen pazifischen Raum und in Südamerika verbreitet, und stellt nach *P. falciparum* den zweithäufigsten ursächlichen Erreger von Malariaerkrankungen weltweit dar (Mendis *et al.*, 2001). Infektionen mit *P. malariae* und *P. ovale* hingegen treten mit einer

Einleitung

Infektionsrate zwischen einem und maximal 30 % eher selten auf (Mueller *et al.*, 2007). Das Verbreitungsgebiet von *P. malariae* umfasst südlich der Sahara liegende Gebiete und den Südwesten des pazifischen Raumes. *P. ovale* tritt dagegen in einem noch kleineren und definierteren Verbreitungsgebiet auf: Infektionen kommen in Teilen des tropischen Afrikas, Neuguinea, Indonesien und den Philippinen vor (Mueller *et al.*, 2007). Typisch für das Verbreitungsgebiet der Malaria ist das Vorkommen von Stechmücken der Gattung *Anopheles*, deren weibliche blutsaugende Vertreter den Parasiten von Mensch zu Mensch als Vektor übertragen (Romoser, 1996). Den 260 endemischen Malariagebieten konnten insgesamt 34 *Anopheles*-Spezies zugeordnet werden (Kiszewski *et al.*, 2004).

1.1.2 Krankheitsbild

Es gibt drei unterschiedliche klinische Verlaufsformen einer Malariainfektion: die *Malaria tertiana*, die *Malaria quartana* und die *Malaria tropica*. Grundlegend für diese Einteilung sind die charakteristischen auftretenden Fieberschübe, denen teilweise Schüttelfrost vorausgeht und die in unterschiedlichen Intervallen auftreten. Bei einer Infektion mit *P. vivax* und *P. ovale* beispielsweise treten alle zwei Tage (*Malaria tertiana*), bei einer Infektion mit *P. malariae* alle drei Tage (*Malaria quartana*) und bei einer Infektion mit *P. falciparum* asynchrone (*Malaria tropica*) Fieberschübe auf. Die *Malaria tropica* zeichnet sich mit dem schwersten Krankheitsverlauf aus. Als charakteristische Symptome können neben Fieber unter anderem Übelkeit, Erbrechen, Anämie, Nierenversagen und Hypoglykämie auftreten. Nach erfolgter Infektion können sich die asexuellen Parasitenstadien von *P. falciparum* (vergleiche 1.2.1) durch Expression des Proteins PfEMP-1 (*erythrocyte membrane protein-1*) an zerebrale Blutkapillarendothelien anheften. Die Sequestration von parasitierten Erythrozyten untereinander (Autoagglutination) und die Bindung infizierter und nicht-infizierter Erythrozyten aneinander (Rosettenbildung) können zu Störungen der Mikrozirkulationen im Gehirn führen. Dies löst die zerebrale Malaria aus, die sich in schweren Bewusstseinsstörungen und Koma manifestiert (Haldar *et al.*, 2007). Für ein Fünftel der an zerebraler Malaria erkrankten Patienten endet dies tödlich.

1.2 Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum*

Plasmodien sind eukaryotische, einzellige Protozoen, die zum Unterstamm der *Apicomplexa* gezählt werden. Als namensgebendes Charakteristikum besitzen invasive Stadien der Vertreter der *Apicomplexa* den Apikalkomplex, welcher bei der Wirtszellinvasion eine entscheidende Rolle spielt (Übersichtsartikel Cowman & Crabb, 2006). Die *Apicomplexa* gliedern sich unter anderem in die Ordnung der *Haemosporida*, zu denen die Familie der

Einleitung

Plasmodiidae zählt. Unter den Vertretern der *Plasmodiidae* befindet sich ebenfalls die Gattung *Plasmodium* (Eckert *et al.*, 2008). Es werden mittlerweile über 200 Spezies der Gattung *Plasmodium* zugewiesen, deren Vertreter neben Menschen unter anderem auch Nager, Vögel, Amphibien und Reptilien infizieren können (Levine, 1988).

1.2.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Mit der Blutmahlzeit der Stechmücke gelangen ca. 15-20 infektiöse Sporozoiten aus ihrer Speicheldrüse in die Haut des Menschen. Von dort aus werden die Sporozoiten innerhalb von Minuten über die Blutbahn zur Leber transportiert (Amino *et al.*, 2007). Die Sporozoiten durchwandern mehrere Leberzellen, bevor sie sich in einer Leberzelle innerhalb einer parasitophoren Vakuole weiterentwickeln (Mota *et al.*, 2001). Die Leberzelle ist der Ort der exoerythrozytären Schizogonie: aus einem Sporozoiten entwickelt sich innerhalb von ein bis zwei Wochen ein Leberschizont, der ca. 10.000-30.000 Merozoiten in die Blutbahn entlassen kann. Im Falle der Malariaerreger *P. vivax* und *P. ovale* können Ruhestadien, sogenannte Hypnozoiten, in den Leberzellen verbleiben, die sich nach Monaten bis Jahren weiterentwickeln und eine erneute Malariainfektion verursachen können.

Die Merozoiten durchlaufen in den Erythrozyten die erythrozytäre Schizogonie, worunter mehrere Zyklen der asexuellen Vermehrung verstanden wird. Die Erkennung eines Erythrozyten durch den Merozoiten, Adhärenz und das Eindringen laufen innerhalb einer Minute ab (Cowman & Crabb, 2006). Um den intrazellulären Merozoiten bildet sich dabei eine parasitophore Vakuole. Die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) sowie die Erythrozytenmembran verändern sich deutlich im Laufe des Parasitenwachstums durch den Einbau von parasitenspezifischen Proteinen in die Wirtszellmembran (Maier *et al.*, 2009). Der Merozoit entwickelt sich weiter zum frühen Trophozoiten (siehe Abbildung 1.2), dem Ringstadium, und anschließend zum späten Trophozoiten, dem metabolisch aktivsten Parasitenstadium. Nach ca. 36 Stunden hat sich aus dem Trophozoiten der frühe Schizont entwickelt. Der späte Schizont weist bereits 16-32 einzelne Merozoiten innerhalb des Erythrozyten auf, die nach dessen Ruptur in das Blut entlassen werden. Zusammen mit den Merozoiten gelangt auch der Inhalt der Nahrungsvakuole wie z.B. Hämoglobin, Lipide, Phospholipide und Proteine in die Blutbahn, die Entzündungsfaktoren rekrutieren und für die charakteristischen Fieberschübe verantwortlich sind. Der asexuelle Vermehrungszyklus dauert von Erythrozyteninvasion bis Merozoitenfreilassung 48 Stunden im Falle von *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale*, während der Zyklus von *P. malariae* 72 Stunden andauert. Dies ist der Grund für die periodischen Fieberschübe, die bei Infektionen mit den sich synchron vermehrenden Parasiten *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* alle 48 bzw. 72

Einleitung

Stunden vorkommen. Da der Vermehrungszyklus von *P. falciparum* asynchron verläuft, treten hier die Fieberschübe ohne eine Periodizität auf.

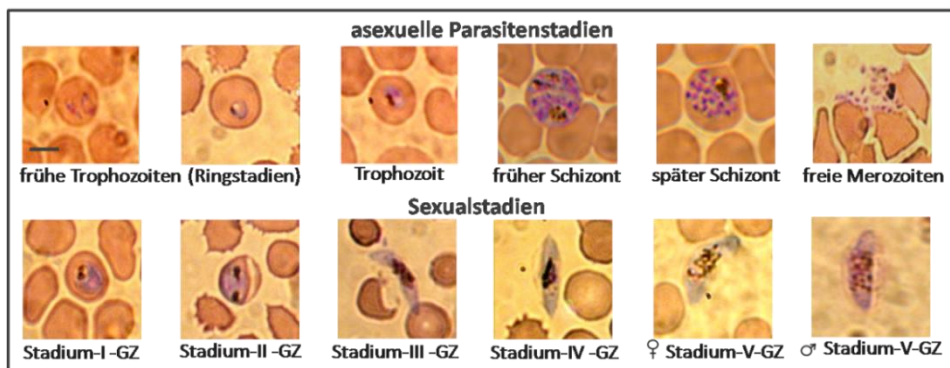


Abbildung 1.2. Charakteristische Morphologie von *in-vitro*-kultivierten Parasitenstadien. Mittels Giemsa-gefärbten dünnen Blutaussstrichen werden die verschiedenen asexuellen Parasitenstadien sowie die fünf Stadien der Sexualformen unterschieden. Weibliche Stadium-V-Gametozyten erscheinen bläulich während männliche Stadium-V-Gametozyten rötlich-violett erscheinen. GZ, Gametozyt; Größenangabe, 4 µm.

In der Blutbahn bilden sich sieben bis 15 Tage nach der ersten asexuellen Vermehrung die Gametozyten als erste Sexualstadien des Parasiten aus (Day *et al.*, 1998; Eichner *et al.*, 2001). Sämtliche aus einem erythrozytären Schizonten freigelassenen Merozoiten infizieren entweder Erythrozyten, um einen neuen Zyklus der asexuellen Vermehrung zu vollenden, oder entwickeln sich zu männlichen oder weiblichen Gametozyten (Bruce *et al.*, 1990; Silvestrini *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Über Faktoren, die den Beginn der Gametozytogenese beeinflussen, liegen verschiedene Forschungsergebnisse vor (Talman *et al.*, 2004), wobei der exakte Auslöser bisher nicht gefunden wurde. Die Gametozytogenese benötigt ca. zehn Tage, in denen der Parasit bestimmte morphologische Veränderungen durchläuft (Talman *et al.*, 2004). Die verschiedenen Entwicklungszustände der Gametozyten werden in fünf Stadien unterteilt, die mittels Giemsa-Färbung lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden können (siehe Abbildung 1.2 und Kapitel 2.2.1.6). Stadium-I-Gametozyten weisen eine runde Form auf und sind schwer von Trophozoiten zu unterscheiden (Alano, 2007). Stadium-II-Gametozyten besitzen hingegen halbmondförmige Zellkörper, die sich in der Entwicklung zu Stadium-III-Gametozyten verlängern und deren Ecken sich abrunden. Stadium-IV-Gametozyten zeichnen sich durch zugespitzte Enden aus, während reife Stadium-V-Gametozyten die charakteristische bananenförmige Gestalt annehmen. Das Verhältnis weiblicher zu männlichen Gametozyten ist starken Schwankungen unterworfen, liegt in jedem Fall allerdings zugunsten der weiblichen Gametozyten und beträgt ca. fünf zu eins. Durch die später durchlaufenden Zellteilungen des männlichen Gametozyten gleicht sich dieses Verhältnis im Mitteldarm auf ca. eins zu eins wieder aus (Übersichtsartikel Pradel, 2007). Gametozyten des Stadiums I-IV akkumulieren hauptsächlich in der Milz und

Einleitung

im Knochenmark von infizierten Individuen und werden erst nach Erlangung des Reifestadiums V in die Blutzirkulation entlassen (Thomson & Robertson, 1935; Smalley & Sinden, 1977; Smalley *et al.*, 1980). Die Gametozyten werden von einer Stechmücke mit der Blutmahlzeit in den Mitteldarm aufgenommen und durch den Umgebungswechsel aktiviert. Die Gametogenese wird ausgelöst durch eine Temperaturabsenkung um mehr als fünf Grad, des mückenspezifischen Moleküls Xanthurensäure und eine Erhöhung des pH-Wertes auf ca. 8,0-8,2 (Sinden, 1989; Billker *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1998; Arai *et al.*, 2001). Die zusätzliche Beteiligung eines Gametogeneseinduzierenden Faktors wird ebenfalls angenommen (Arai *et al.*, 2001). Innerhalb von Minuten rundet sich der weibliche Gametozyt ab und bricht aus dem Erythrozyten aus. Der männliche Gametozyt durchläuft drei Genomreplikationen, gefolgt von drei Kernteilungen und entwickelt sich in acht motile Mikrogameten (Janse *et al.*, 1986; Janse *et al.*, 1988). Dieser Vorgang wird als Exflagellation bezeichnet. Mikrogameten bleiben zunächst nach Ausbruch aus dem Erythrozyten noch am aktivierten Mikrogametozytenzellkörper heften. Die Mikrogameten schlagen umliegende parasitierte und nicht-parasitierte Erythrozyten an sich heran, ein Teil von ihnen bleibt dabei an Zellen heften und bilden rosettenartige Exflagellationskomplexe aus, die lichtmikroskopisch erkennbar sind (Abbildung 2.4; Pradel, 2007). Die Mikrogameten lösen sich im Laufe der Exflagellation vom restlichen Zellkörper ab, um die Makrogameten zu befruchten. Die Fertilisation erfolgt innerhalb von Sekunden, wobei die Plasmalemma der beiden Gameten fusionieren, gefolgt vom Eintritt des männlichen Axonems und Nukleus und der anschließenden Verschmelzung der beiden Zellkerne (Sinden, 1984). Die Zygote entwickelt sich innerhalb der nächsten zehn bis 30 Stunden zum tetraploiden motilen Ookineten, der in das Mitteldarmepithel einwandert und sich an der basalen Lamina festsetzt. Der Ookinet rundet sich ab und es bildet sich eine dicke extrazelluläre Matrix um die sich entwickelnde Oozyste, die während der Oozystenreifung dünner wird (Vanderberg *et al.*, 1967; Aikawa, 1971). Im Laufe der Sporogonie bilden sich innerhalb der Oozyste tausende von Sporozoiten, deren Entwicklung neun bis 14 Tage nach der Blutmahlzeit der Mücke abgeschlossen ist (Sinden, 1984). Nach der Ruptur der Oozyste werden die Sporozoiten über die Hämolymphe unter anderem in die Speicheldrüsen der Stechmücke transportiert und akkumulieren dort (Simonetti, 1996). Mit einer erneuten Blutmahlzeit der Stechmücke werden die infektiösen Sporozoiten wieder in den Menschen injiziert, was den Lebenszyklus von *Plasmodium* schließt (Abbildung 1.3).

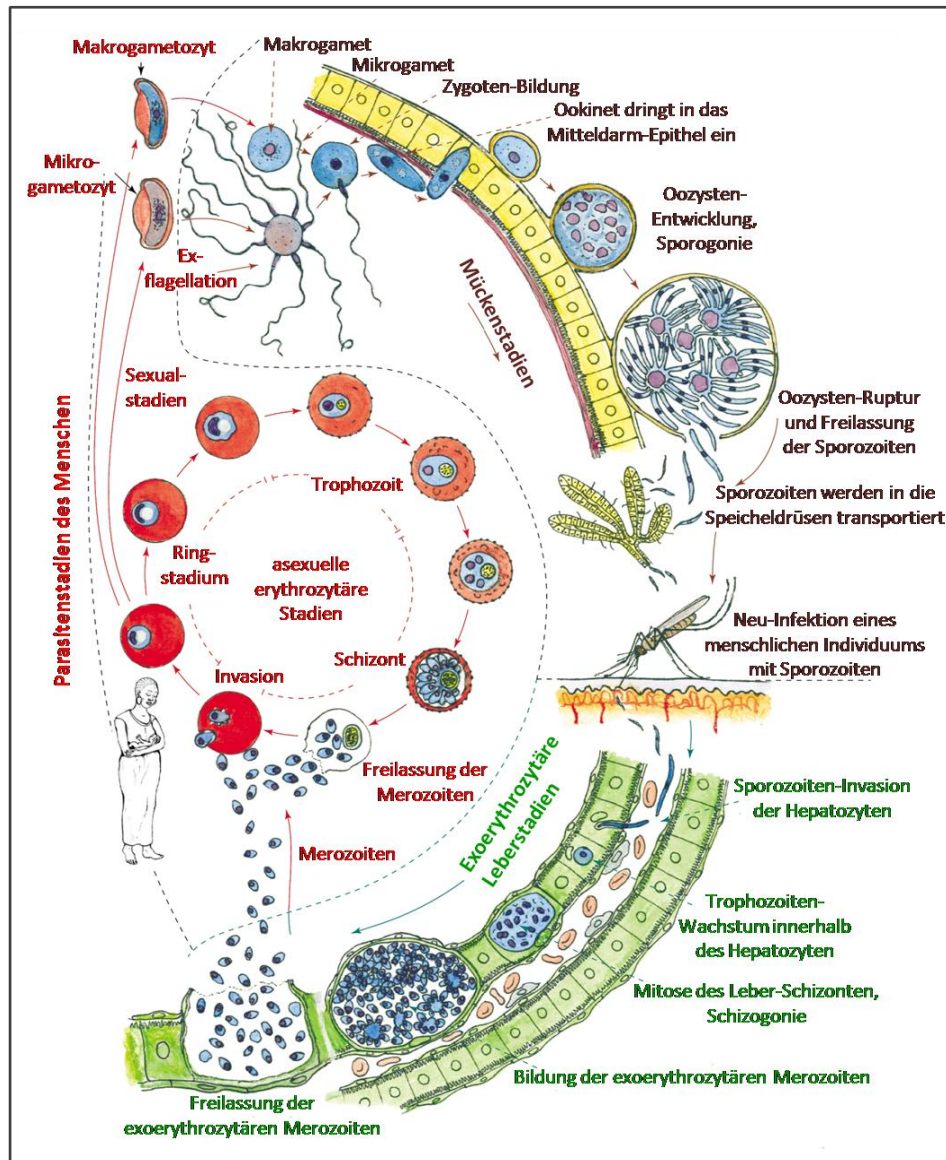


Abbildung 1.3. Der Lebenszyklus von *P. falciparum*. Die Vermehrung des menschlichen Malariaerregers zeichnet sich durch einen Wirtswechsel zwischen Mensch und Stechmücke sowie durch eine asexuelle und eine sexuelle Vermehrungsphase aus.²

1.2.2 Morphologie

Der Lebenszyklus von *Plasmodium* ist gekennzeichnet von der hauptsächlich intrazellulären Entwicklung des Parasiten unter verschiedenartigen Lebensbedingungen, welche aus dem Wirtswechsel von Stechmücke zu Mensch resultieren (siehe Kapitel 1.2.1). Dies geht einher mit vielen morphologischen Veränderungen des Parasiten. Der Apikalkomplex der *Apicomplexa* spielt eine entscheidende Rolle bei der Invasion der Wirtszelle (Cowman & Crabb, 2006). So besitzt die *Plasmodium*-Zelle am apikalen Ende des invasiven Merozoitenstadiums den Apikalkomplex, welcher aus in drei polaren Ringen angeordneten Mikrotubulibündeln, zwei keulenförmig angelegten Rhoptrien und vesikelartigen Mikronemen

Einleitung

besteht (siehe Abbildung 1.6A für die schematische Darstellung der intrazellulären Morphologie eines Merozoiten). Die Rhoptrien und Mikronemen stellen zusammen mit den dichten Granula und neuartig beschriebenen Vesikeln namens Exonemen (Yeoh *et al.*, 2007) sekretorisch aktive Organellen dar. Als weiteres wichtiges Merkmal für die Zugehörigkeit zu den *Apicomplexa* besitzt *Plasmodium* eine durch endosymbiontische Einwanderung erlangte relikte Plastide, den Apikoplasten (Foth & McFadden, 2003; Gould *et al.*, 2008). Dieser liegt in enger Assoziation mit dem Mitochondrium vor. Die *Plasmodium*-Zelle ist von drei Membranen umgeben (Aikawa, 1966; Scalzi & Bahr, 1968), deren Gesamtheit mit einem eng assoziierten Paar von längsorientierten Mikrotubuli als Pellikularkomplex bezeichnet wird. Intrazelluläre Parasitenformen sind zusätzlich zum Pellikularkomplex von der parasitophoren Vakuolenmembran umgeben, die nach Invasion in die Wirtszelle um den Parasiten entsteht (Lingelbach & Joiner, 1998). Bei deren Bildung werden Komponenten aus der Wirtszelle und dem Parasiten rekrutiert. Typische Zellorganelle sind außerdem die Nahrungsvakuole, das endoplasmatische Retikulum, der Golgi Apparat, die Ribosomen und der Zellkern. Die Gametozyten als eine Form der Sexualstadien bei *Plasmodium* zeichnen sich zusätzlich durch das Vorkommen kleiner, runder, elektronendichter osmiophiler Körper aus, die in den weiblichen Gametozyten angereichert sind (Aikawa, 1988; Pradel, 2007; die Ultrastruktur von Sexualstadien ist in Abbildung 1.4 dargestellt). Den osmiophilen Körpern wird unter anderem durch die darin lokalisierten Proteine *Pfg377* und *Pfpeg3* (*P. falciparum* *proteins of early gametocytes*) eine Rolle beim Ausbruch aktivierter Gametozyten aus der Wirtszelle zugesprochen (de Koning-Ward *et al.*, 2008; Ponzi *et al.*, 2009). Die Nahrungsvakuole der Gametozyten enthält große Mengen des Malariapigments, welches ein Abfallprodukt des Hämoglobinkatabolismus darstellt (siehe 1.4.1).

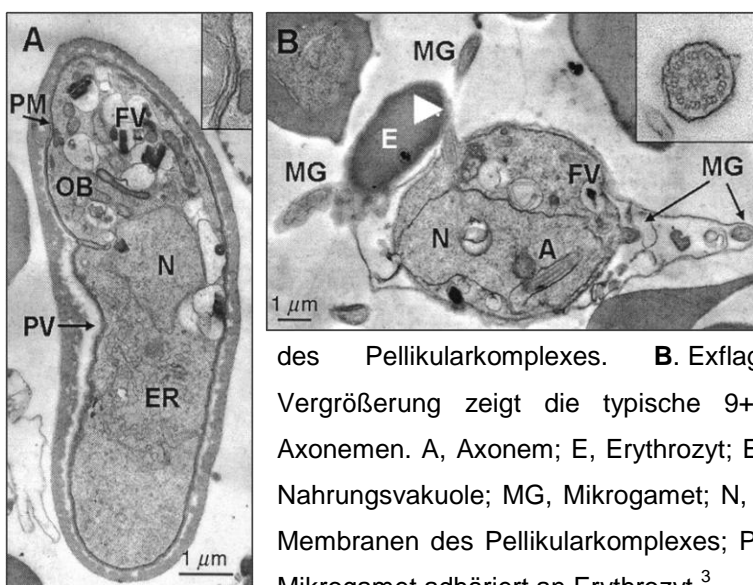


Abbildung 1.4. Darstellung der subzellulären Ultrastruktur von *P. falciparum*-Sexualstadien anhand von transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen. **A.** Reifer Gametozyt. Die Vergrößerung zeigt die Membranen des Pellikularkomplexes. **B.** Exflagellierender Mikrogametozyt. Die Vergrößerung zeigt die typische 9+2 Struktur der Mikrotubuli in den Axonemen. A, Axonem; E, Erythrozyt; ER, endoplasmatisches Retikulum; FV, Nahrungsvakuole; MG, Mikrogamet; N, Nukleus; OB, osmiophile Körper; PM, Membranen des Pellikularkomplexes; PV, parasitophore Vakuole; Pfeilspitze, Mikrogamet adhärert an Erythrozyt.³

Einleitung

Nach der Aktivierung der Gametozyten im Mitteldarm der Stechmücke degradiert der Pellikularkomplex (Frau PD Dr. G. Pradel, unveröffentlichte Daten). Das Zytoplasma von Makrogameten enthält die typischen Zellorganellen der intrazellulären Gametozyten. Der Mikrogamet besteht aus einem Axonem, einem Kinetosom und dem Nukleus, und enthält keine Zellorganellen wie Mitochondrium oder Apikoplast (Sinden *et al.*, 1978; Aikawa, 1988; Okamoto *et al.*, 2009). Während der Fertilisation des Makrogameten durch den Mikrogameten verschmelzen die Membranen beider Zellen miteinander, gefolgt von der Fusion beider Zellkerne. Das Axonem des Mikrogameten verschwindet im Zytoplasma der Zygote.

1.2.3 Sexualstadienspezifische Proteine

Die Entwicklung der Parasiten während der Gametozytogenese und anschließender Gametogenese geht einher mit der Expression von sexualstadienspezifischen Proteinen (Pradel, 2007). Proteine die in der Reproduktion von *Plasmodium* eine essentielle Rolle spielen, sind für die medizinische Forschung von besonderem Interesse, da eine spezifische Blockierung dieser Proteine die Entwicklung des Parasiten in der Stechmücke unterbrechen würde und so zur Eindämmung der Krankheit beitragen könnte (siehe Kapitel 1.3.1. transmissionsblockierende Vakzine). Gametozyten- und Gametenproteine stellen somit exzellente Vakzinziele dar (Saul, 2007; Lavazec & Bourgouin, 2008). Proteine der jungen Gametozyten umfassen z.B. *PfPeg3*, *PfPeg4* (Furuya *et al.*, 2005, Silvestrini *et al.*, Lanfrancotti *et al.*, 2007) und *Pfs16* (Baker *et al.*, 1994; Bruce *et al.*, 1994; Lanfrancotti *et al.*, 2007). *Pfs16* ist lokalisiert in den Membranen der parasitophoren Vakuole, der Nahrungsvakuole und in spaltenartigen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas der Wirtszelle. *Pfs230* und *Pfs48/45* sind mit der parasitären Plasmamembran assoziierte Proteine, die ab Stadium-II-Gametozyten exprimiert werden und auch im Laufe der Gametogenese bis zur Fertilisation auf der Oberfläche der Gameten exponiert bleiben (Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Vermeulen *et al.*, 1986; Quakyi *et al.*, 1987; Kocken *et al.*, 1993; Williamson *et al.*, 1993; Williamson *et al.*, 1995). *Pfs230* und *Pfs48/45* bilden dabei in enger Assoziation einen stabilen Proteinkomplex, wobei *Pfs48/45* direkt durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Membran verbunden vorliegt (Kumar, 1987; Kumar & Wikel, 1992). Kürzlich konnten Scholz *et al.* zeigen, dass *Pfs230* zusätzlich mit dem sexualstadienspezifischen Protein *PfCCp4* (*Limulus coagulation factor C domain-containing proteins*) in der parasitophoren Vakuole interagiert (2008). *Pfs230-knockout*(KO)-Parasiten in denen das Gen für *Pfs230* ausgeschaltet bzw. teilweise zerstört wurde, weisen eine reduzierte Fähigkeit der Bildung von Exflagellationszentren, der Bildung von Oozysten und eine reduzierte Infektiösität von Stechmücken auf (Eksi *et al.*, 2006). Das Ausschalten

Einleitung

von *Pfs48/45* resultiert in einer reduzierten Befruchtungsfähigkeit der Mikrogameten und einer verminderten Produktion von Zygoten und Oozysten im Mitteldarm der Stechmücke (van Dijk *et al.*, 2001). *Pfs25* wird auf der Oberfläche von nicht-aktivierten und aktivierten Gametozyten, Makrogameten, Zygoten sowie Ookineten exprimiert (Vermeulen *et al.*, 1985; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990; Scholz *et al.*, 2008). *Pfs25* wird ebenso wie dessen Paralog *Pfs28* als transmissionsblockierendes Vakzinekandidatenprotein gehandelt. *Pfs28* wird in Zygoten, Retortenstadien und Ookineten exprimiert (Duffy & Kaslow, 1997). Beide Proteine sind über einen GPI-Anker mit der parasitären Plasmamembran verbunden. Es konnte gezeigt werden, dass *P25* und *P28* in *P. berghei* für die Ookinetenentwicklung im Mitteldarm der Stechmücke essentiell sind, da die Entwicklung des Parasiten unterbrochen wurde, wenn beide Proteine fehlten (Tomas *et al.*, 2001). Zu den sexualstadienspezifischen Proteinen zählt auch die *PfCCp*-Proteinfamilie, deren sechs Mitglieder sich strukturell durch den Besitz von Multiadhäsionsdomänen auszeichnen und im Laufe der Gametozytogenese in der parasitophoren Vakuole exprimiert werden (Abbildung 1.5; Pradel *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2006; Scholz *et al.*, 2008, Simon *et al.*, 2009). Gen-*knockout*-Studien für *PfCCp2* und *PfCCp3* konnten nachweisen, dass diese Proteine für die Parasitenentwicklung im Mitteldarm der Stechmücke essentiell sind (Pradel *et al.*, 2004). Das Ausschalten von *PfCCp4* dagegen resultierte in einer mit Wildtypparasiten vergleichbaren Befruchtungsfähigkeit und Oozystenproduktion (Scholz *et al.*, 2008). In der Stechmücke wird derzeit die Entwicklung der jüngst beschriebenen *PfCCp1*- und *PfFNPA*-KO-Parasiten untersucht (Simon *et al.*, 2009).

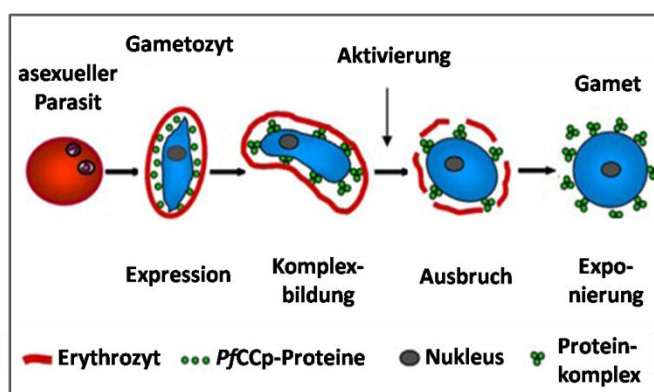


Abbildung 1.5. Die Mitglieder der *PfCCp*-Proteinfamilie bilden im Laufe der Gametozytogenese in der parasitophoren Vakuole Multiproteinkomplexe. Nach der Gametozytenaktivierung werden die Proteinkomplexe auf der Makrogametenoberfläche exponiert und begünstigen möglicherweise die Fertilisation (Simon *et al.*, 2009).⁴

Aufgrund der Tatsache, dass polyklonale Antikörper gegen ausgewählte Domänen der *PfCCp*-Proteine in der Lage sind, eine komplementvermittelte Reduktion der Exflagellationsfähigkeit von Wildtypparasiten zu induzieren, werden sie als potentielle Kandidaten für transmissionsblockierende Vakzine gehandelt (Scholz *et al.*, 2008). *PfCCp*-Proteine bilden im Laufe der Gametozytogenese Multiproteinkomplexe, die nach der Gametozytenaktivierung mit der Makrogametenoberfläche assoziiert bleiben (Simon *et al.*,

2009; siehe Abbildung 1.5). Es wird angenommen, dass die Proteinkomplexe im Mitteldarm der Stechmücke an Zell-Adhäsionsprozessen beteiligt sind. Zusätzlich wird spekuliert, dass die Proteinkomplexe eine Schutzfunktion gegenüber im Mitteldarm vorliegenden aggressiven Substanzen einnehmen. Zusammengenommen würde dies die Fertilisation begünstigen.

1.3 Kontrollstrategien

Die WHO führte von 1955 bis 1970 das *Global-Eradication-of-Malaria*-Programm mit dem ehrgeizigen Ziel durch, Malaria weltweit auszurotten. Der Einsatz von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) zur Eindämmung der Ausbreitung der Plasmodienüberträger (*Anopheles spp.*) und die Anwendung von Chloroquin als Malariamedikament stellten die zentralen Aspekte des Programms dar. Sich entwickelnde Resistenzen seitens der Vektoren und der Erreger führten jedoch zum Scheitern des Programms. Bemühungen, die Verbreitung von Malaria zu kontrollieren, sind seit Ende der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wieder vermehrt in den Fokus des öffentlichen Interesses geraten (Nantulya *et al.*, 2007). Strategien dafür beinhalten unter anderem die Anwendung von insektizidbehandelten Bettnetzen, die Insektizidbehandlung von Innenräumen, Artemisinin-basierende Kombinationstherapien (siehe 1.3.2) und die periodische präventive Behandlung von schwangeren Frauen.

1.3.1 Impfstoffforschung

Trotz jahrelanger intensiver Forschung ist bis dato kein Malariaimpfstoff entwickelt worden, der 100 %igen Schutz vor der Krankheit verleiht (Bremner & Plowe, 2009; Sarda *et al.*, 2009). Der parasitäre Immunevasionsmechanismus fundiert in der Komplexität des Lebenszyklus von *Plasmodium* und seiner Replikation innerhalb von Wirtszellen die z.T. keine körperfremden Antigene zur Immunsystemaktivierung präsentieren können, sowie ihrer Fähigkeit der Wirtsimmunabwehr und dem wirtseigenen *Screening* der Milz zu entkommen (Übersichtsartikel Casares & Richie, 2009). Verschiedene Strategien, um eine sterile Immunantwort zu erzielen, wurden bisher erforscht: unter anderem die Entwicklung von Untereinheitenvakzinen (Übersichtsartikel Jones & Hoffman, 1994; Tsuji & Zavala, 2001), die Anwendung von viralen Vektoren (Rodrigues *et al.*, 1997; Draper *et al.*, 2008; Reyes-Sandoval *et al.*, 2008), DNA-Plasmid-Vakzinierungen (Kumar *et al.*, 2002; Moorthy *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2007) und die Immunisierung mit attenuierten Sporozoiten (Nussenzweig *et al.*, 1967; Clyde *et al.*, 1973; Hoffman *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2005; Purcell *et al.*, 2008). Impfstoffkandidaten werden je nach Angriffspunkt im Lebenszyklus von *Plasmodium*

Einleitung

in die präerythrozytären, die erythrozytären und die transmissionsblockierenden Impfstoffe eingeteilt (siehe Abbildung 1.4).

Präerythrozytäre Vakzine

Das Hauptaugenmerk der präerythrozytären Vakzinforschung liegt auf dem Sporozoitenprotein PfCSP (*circumsporozoite protein*; Stewart & Vanderberg, 1988; Stewart & Vanderberg, 1991), das die gesamte Oberfläche des Sporozoiten bedeckt (Yoshida *et al.*, 1980). Der Impfstoff RTS,S ist der in der Entwicklung bisher am weitesten fortgeschrittene Impfstoff und basiert auf repetitiven Elementen und einer C-terminalen Domäne von PfCSP sowie dem Oberflächenprotein des Hepatitis B Virus (Bojang, 2006). Kürzlich konnten Sacarlal *et al.* in einer in Mozambique an Kindern im Alter von ein bis vier Jahren durchgeführten Langzeitstudie den Effekt von RTS,S-Impfungen nachweisen (2009). Der Impfstoff zeigte eine Effizienz von 26 % an auftretenden Malariaerkrankungen und 38 % aller Erkrankungen an schwerer Malaria. In Kombination mit einem anderen Adjuvans zeigte die RTS,S-Impfung eine ungleich stärkere Immunantwort in den getesteten Personen (Kester *et al.*, 2009). Die Eignung der Sporozoitenproteine TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein* oder auch SSP2 für *sporozoite surface protein 2*) und LSA-1 (*liver stage antigen-1*) für entsprechende Impfstoffe wird ebenfalls evaluiert (Moormann *et al.*, 2009).

Erythrozytäre Vakzine

Impfstoffkandidaten für die erythrozytären Vakzine stellen unter anderem die Proteine MSP-1, -3 (*merozoite surface protein-1/-3*) und AMA-1 (*apical membrane antigen-1*) dar (Pan *et al.*, 1999; Dutta *et al.*, 2002; Pichyangkul *et al.*, 2004; Druilhe *et al.*, 2005; Withers *et al.*, 2006; Sirima *et al.*, 2007; Moormann *et al.*, 2009). Diese essentiellen Proteine von Merozoit bzw. Merozoit und Sporozoit sind an der Wirtszellinvasion beteiligt (Silvie *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2005; Koussis *et al.*, 2009). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Impfstoff basierend auf AMA-1 eine hohe Immunogenität hervorruft (Lyke *et al.*, 2009). Ogotu *et al.* demonstrierten in einer Studie an Kindern in Kenia jedoch, dass der auf MSP-1 basierende Impfstoff FMP1/AS02 keinen Schutz vor einer Malariaerkrankung lieferte (2009).

Transmissionsblockierende Vakzine

Die Sexualstadien der Malariaerreger stellen den Angriffspunkt der transmissionsblockierenden Vakzine (TBV) dar. Hintergrund dieser altruistischen Vakzine ist die Blockierung der Entwicklung des Parasiten in der Steckmücke durch mit der Blutmahlzeit aufgenommene, im Wirt gebildete Antikörper gegen parasitenspezifische Proteine (Carter & Chen, 1976; Gwadz, 1976; Kaslow, 2002; Saul, 2007; Lavazec & Bourgoïn, 2008). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Antikörper gegen gametentypische Proteine wie

Einleitung

Pfs230, *Pfs25*, *Pfs48/45* und *Pfs28* die Transmission durch die Stechmücke verhindern (Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Quakyi *et al.*, 1987; Kaslow *et al.*, 1988; Williamson *et al.*, 1995; Duffy & Kaslow, 1997). Im Jahre 2000 evaluierte eine Expertenkommission das Potential der bekannten Kandidatenproteine für die Entwicklung eines transmissionsblockierenden Impfstoffes (WHO, 2000). Die bis dato führenden und am weitesten charakterisierten sexualstadienspezifischen Proteine *Pfs25/Pvs25*, *Pfs28/Pvs28*, *Pfs48/45* und *Pfs230* wurden dabei als mögliche Vakzinekandidatenproteine herausgestellt. Der am weitesten entwickelte Impfstoffkandidat unter den TBV ist *Pfs25* bzw. *Pvs25*. Wu *et al.* konnten 2008 zeigen, dass rekombinantes *Pfs25* nach Immunisierung in Probanden Antikörpertiter produzierten, die eine transmissionsblockierende Aktivität ermöglichen würden.

1.3.2 Medikamentenentwicklung

Antimalariamedikamente sind seit hunderten von Jahren bekannt und im Einsatz (Übersichtsartikel Schlitzer, 2007). Zu den frühen Medikamenten zählen die Rinde des *Cinchona*-Baumes (*Cinchona officinalis*) seit dem 17. Jahrhundert in Peru (Meshnick, 1997) oder Extrakte aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) in China seit über 2000 Jahren (Hsu, 2006). Chinin wurde nach der Isolierung 1820 aus der *Cinchona*-Rinde flächendeckend eingesetzt. Später wurde es durch das erste synthetische Malariamedikament Chloroquin ersetzt (Stocks *et al.*, 2001). Seit den 50er Jahren wurde Chloroquin nahezu ausschließlich als Malariamedikament weltweit eingesetzt. Fast zeitgleich traten Chloroquin-resistente *P. falciparum*-Parasiten und etwas später Chloroquin-resistente *P. vivax*-Stämme auf (Talisuna *et al.*, 2004) was dazu führte, dass Chloroquin nicht mehr in der Malariatherapie in endemischen Gebieten eingesetzt werden kann. Weitere wichtige Medikamente umfassen unter anderem Mefloquin (Lariam[®]), Halofantrin (Halfan[®]), Pyrimethamin/Sulfadoxin (Fansidar[®]), Dapson/Chlorproguanil (LapDap[®]), und Atovaquon/Proguanil (Malarone[®]). Diese Medikamente können aufgrund von Resistenzen des Malariaerregers, unerwünschten Nebenwirkungen oder aus Kostengründen allerdings nicht breitflächig in der Malariatherapie eingesetzt werden (Übersichtsartikel Rosenthal 1998; Schlitzer, 2007). Das Repertoire der Malariamedikamente umfasst außerdem Antibiotika wie z.B. Doxycyclin und Clindamycin, die als Kombinationsmedikamente mit Chinin oder Mefloquin eingesetzt werden (Schlitzer, 2007). Antibiotika wirken in Apikomplexa gegen das Mitochondrium und den Apikoplasten als Organellen prokaryotischen Ursprungs. Dabei besonders ist der verzögerte Wirkeintritt, der auch als „*delayed death phenotype*“ bezeichnet wird, da die Parasiten erst im zweiten asexuellen Vermehrungszyklus absterben. Seit den 90er Jahren werden *Artemisinin*-basierende Kombinationsmedikamente in der Malariatherapie eingesetzt und von der WHO als Medikament der Wahl empfohlen.

Mittlerweile treten jedoch ebenfalls gegen diese Kombinationsmedikamente resistente *Plasmodium*-Stämme auf (WHO, 2007). Ein Vorteil der *Artemisinin*-basierenden Medikamente ist ihre transmissionsblockierende Aktivität, was unter den Antimalariamitteln bisher einzigartig ist (White, 1999). Medikamente, die die Sexualentwicklung von *Plasmodium* unterbinden, werden als transmissionsblockierende Medikamente bezeichnet (TBM) und zählen gemeinsam mit den TBV zu den transmissionsblockierenden Strategien (TBS). Kürzlich konnte eine Studie die transmissionsblockierende Aktivität von Centanamycin mit einer Reduktion von 99 % der gebildeten Sporozoiten belegen (Yanow *et al.*, 2008).

Die voranschreitende Resistenzenentwicklung der Plasmodien gegen vorhandene Malariamedikamente erhöht den Druck, neue Medikamente zu entwickeln. Potentielle Ziele neuer Medikamente stellen unter anderem Proteasen der Malariaerreger dar (McKerrow *et al.*, 1993; Rosenthal, 1998; Fidock *et al.*, 2008; siehe Kapitel 1.4). In diesem Zusammenhang sind Studien, in denen Merozoiten an der Erythrozyteninvasion durch die Anwendung synthetischer Peptid-Inhibitoren gehindert werden konnten, sehr vielversprechend (Schrevel *et al.*, 1988; Mayer *et al.*, 1991). Nicht-peptidähnliche Substanzen mit antiplasmodialer Aktivität werden ebenfalls als mögliche Ziele der Medikamentenforschung angesehen (Dude *et al.*, 2008) Kürzlich zeigten Parvanova *et al.*, dass die Anwendung eines Signalpeptid-Protease-Inhibitors die Leberstadienentwicklung von *Plasmodium* beeinträchtigt (2009). Ein wichtiges Beispiel für die erfolgreiche Therapie einer Infektionskrankheit durch die Anwendung von synthetischen Aspartprotease-Inhibitoren ist die Behandlung von AIDS anzuführen (Wlodawer & Vondrasek, 1998; Tomasselli & Heinrikson, 2000). Neuerdings wird die Wirkung von HIV-Protease-Inhibitoren auf Malariainfektionen untersucht (Andrews *et al.*, 2007).

1.4 Die Rolle von Proteasen im Lebenszyklus der Malariaerreger

1.4.1 Proteasen bei *Plasmodium* und ihre Wirkungen

Proteasen werden allgemein in sechs Kategorien eingeteilt: es gibt die Aspart-, Cystein-, Metallo-, Serin-, Threonin- und Glutamatproteasen (Barrett & Rawlings, 2007; Rawlings *et al.*, 2008). Die Nomenklatur bezieht sich auf den Mechanismus ihrer katalytischen Prozessierung bzw. auf ihre katalytische Triade. Die Proteasen einer Kategorie werden weiterhin in Proteasenstämme, Familien und Spezies unterteilt, was auf der Grundlage von Proteinsequenzähnlichkeiten erfolgt. Die 92 neu identifizierten Proteasen von *P. falciparum* werden in 26 Familien eingeteilt (Wu *et al.*, 2003), wobei die Aufklärung ihrer Funktion Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten ist. Ein Beispiel für die Beteiligung von Proteasen im Lebenszyklus von *Plasmodium* ist der Prozess des Ausbruchs intrazellulär lebender

Einleitung

Schizonten. Wie genau die Freilassung der Merozoiten aus der Wirtszelle geschieht, ist bis heute nicht genau geklärt, allerdings existieren vier verschiedene Erklärungsmodelle, wie die sich die Merozoiten aus der sie umgebenden parasitophoren Vakuolen- und Erythrozytenmembran befreien. Alle vier Modelle des Ausbruchs asexueller Parasiten liefern Hinweise darauf, dass dabei Proteasen an der Membran- und Zytoskelettdestabilisierung beteiligt sind (Übersichtsartikel Blackman, 2008; Dowse *et al.*, 2008). Dem ersten Modell liegt eine Fusion der beiden Membranen vor dem Parasitenaustritt zugrunde (Winograd *et al.*, 1999), während gemäß des zweiten Modells die Ruptur der beiden Membranen zeitgleich und explosionsartig geschieht (Glushakova *et al.*, 2005). Zusätzlich dazu ist die zweistufige Freilassung der Merozoiten postuliert worden. Den Ergebnissen einer Studie zufolge geht die Ruptur der PVM der Ruptur der Erythrozytenmembran voraus (Wickham *et al.*, 2003), andere Studien zeigen, dass die Ruptur der Erythrozytenmembran vor der Ruptur der PVM erfolgt (Salmon *et al.*, 2001; Soni *et al.*, 2005). Ponzi *et al.* konnten kürzlich belegen, dass die Ruptur der PVM eine Voraussetzung für die Ruptur der Erythrozytenmembran und damit Freilassung aktivierter Gametozyten darstellt (2009).

Eine Voraussetzung für den Merozoitenausbruch ist die Freilassung der Subtilisin-ähnlichen Protease PfSub1 (*subtilisin-like protease 1*) aus neuartigen Organellen namens Exonemen in die parasitophore Vakuole (Yeoh *et al.*, 2007). Neben PfSub1 ist die Dipeptidyl-Aminopeptidase DPAP3 (*dipeptidyl aminopeptidase-3*) an der proteolytischen Prozessierung der SERA(*serine repeat antigen*)-Familie innerhalb der parasitophoren Vakuole und der damit verbundenen regulierten Wirtszellruptur beteiligt (Yeoh *et al.*, 2007; Arastu-Kapur *et al.*, 2008). Weiterhin sind bestimmte Wirtsproteasen bei der Erythrozytenruptur von Bedeutung, wie z.B. eine Urokinase und Calpain-1 (Roggwiller *et al.*, 1997; Chandramohanadas *et al.*, 2009). Im Verlauf der Merozoiteninvasion in Erythrozyten werden Oberflächenproteine und Proteine sekretorischer Organellen des Parasiten durch eine oder mehrere Proteasen prozessiert (Übersichtsartikel Carruthers & Blackman, 2005; Koussis *et al.*, 2009). Ein Beispiel hierfür sind die Proteine MSP-1 und AMA-1, welche durch die Proteasen PfSub1 und PfSub2 bzw. nur PfSub2 gespalten werden (Harris *et al.*, 2005; Koussis *et al.*, 2009). Die proteolytische Prozessierung von Oberflächenproteinen bei der Zellinvasion stellt einen immer wiederkehrenden Ablauf dar, der bei den invasiven Parasitenstadien essentiell zu sein scheint. Die Sporozoitenproteine TRAP und CSP werden beispielsweise nach der Invasion des Sporozoiten in den Hepatozyten durch Rhomboidproteasen (Baker *et al.*, 2006). bzw. durch das Wirtszellproteasom und Aspartatproteasen proteolytisch gespalten (Bongfen *et al.*, 2007; Bongfen *et al.*, 2008).

Die erythrozytäre Parasitenvermehrung geht einher mit dem Abbau von Wirtszellhämoglobin, um unter anderem Aminosäuren für die parasitäre Proteinbiosynthese bereit zu stellen (Sherman, 1979). Der sequentielle Hämoglobinabbau erfolgt in der sauren Nahrungsvakuole

Einleitung

des Parasiten (Francis *et al.*, 1997b; siehe Abbildung 1.6B) unter Beteiligung von Aspartat- (Francis *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 1997a), Cystein- (Rosenthal *et al.*, 1988) und Metalloproteasen (Eggleston *et al.*, 1999).

Zunächst werden die Plasmepsine (Aspartatproteasen) durch Falcipaine (Cysteinproteasen) in der Nahrungsvakuole aktiviert (Drew *et al.*, 2008). Hämoglobin wird anschließend von Plasmepsin I, II, IV und einer Histoaspartatprotease (*histoaspartic protease*, HAP, oder auch Plasmepsin III genannt) in seine Bestandteile Globin und Häm (Ferriprotoporphyrin IX) zerlegt. Subramanian *et al.* postulierten 2009, dass Falcipain-2 und -3 ebenfalls an der initialen Hämoglobinspaltung in der Nahrungsvakuole involviert sind. Nachfolgend wird Globin unter Beteiligung von Falcipain-2 und -3 in größere Proteinfragmente prozessiert (Shenai *et al.*, 2000; Sijwali *et al.*, 2001; Sijwali & Rosenthal, 2004). Die weitere Aufspaltung erfolgt durch die Metalloprotease Falcilysin (Eggleston *et al.*, 1999).

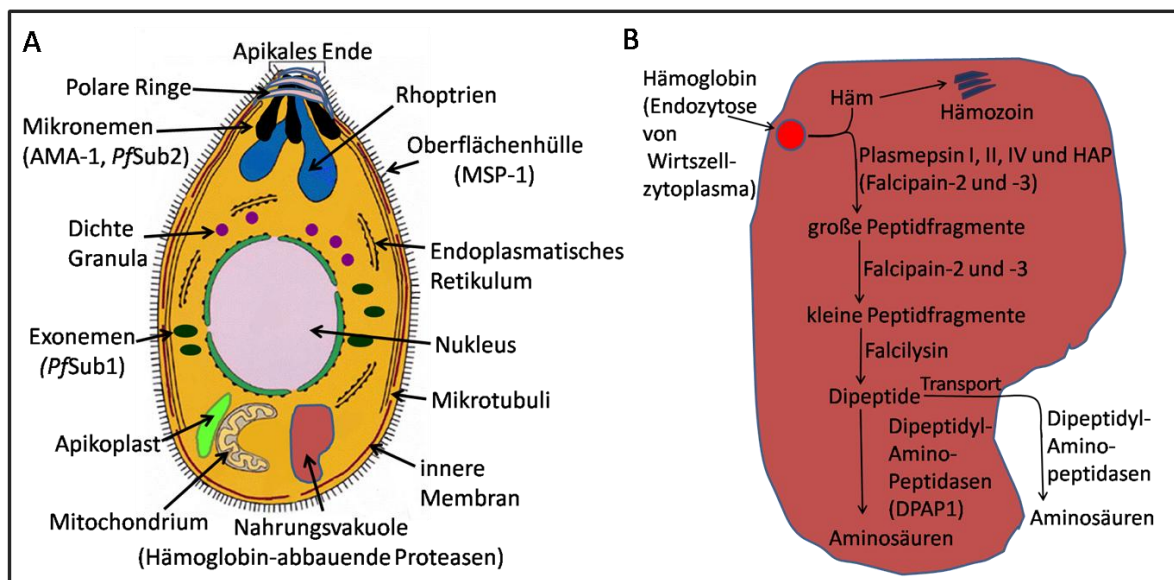


Abbildung 1.6. Schematische Darstellung eines Merozoitenquerschnittes (A) und des Hämoglobinabbaus in der Nahrungsvakuole von *P. falciparum* (B). **A.** Intrazelluläre Morphologie eines Merozoiten mit seinen wichtigsten Zellorganellen und Zellstrukturen sowie die Lokalisation der Proteasen PfSub1, PfSub2, der Proteine AMA-1 und MSP-1. **B.** In der sauren Nahrungsvakuole findet der Hämoglobinabbau unter anderem zur Bereitstellung von Aminosäuren für die Proteinbiosynthese des Parasiten statt. Die Peptidprozessierung erfolgt unter Beteiligung von Aspartat-, Cystein-, und Metalloproteasen.⁵

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Falcilysin zusätzlich Aktivität im Apikoplasten zeigt (Ponpuak *et al.*, 2007). Die kleinen Peptidfragmente werden anschließend von Dipeptidyl-Amino-peptidasen in der Nahrungsvakuole und zusätzlich nach dem Transport in das Zytoplasma in Aminosäuren zerlegt (Dalal & Klemba, 2007). Ein Vertreter der in der Nahrungsvakuole lokalisierten Amino-peptidasen ist DPAP1 (Klemba *et al.*, 2004). Der

Einleitung

Hämoglobinabbau bietet einen exzellenten Angriffspunkt für neue Malariamedikamente (Coombs & Mottram, 1997; Francis *et al.*, 1997b; Rosenthal, 1999), da die Bereitstellung von Aminosäuren für das erythrozytäre Parasitenwachstum essentiell ist.

Einige wenige Studien haben bisher untersucht, ob und welche Proteasen in sexualstadienspezifische Prozesse involviert sind (vergleiche 1.4.2). Ein Beispiel hierfür ist das typische Gametenprotein *Pfs230*, welches im Laufe der Gametogenese einer proteolytischen Prozessierung unterliegt (Williamson *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1996; Brooks & Williamson, 2000). Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Proteasom und die damit einhergehende regulierte zelluläre Proteindegradation eine wichtige Rolle in der Gametozytogenese und der Oozystenentwicklung spielt (Czesny *et al.*, 2009). Eine an *P. berghei* durchgeführte Studie konnte belegen, dass Proteasen verschiedener Kategorien ebenfalls an der Exflagellationszentren- und Ookinetenbildung beteiligt sind (Torres *et al.*, 2005). Aly und Matuschewski postulierten 2005, dass ein Gen namens *ecp1* (*egress cysteine protease 1*) bei *P. berghei* für eine Protease kodiert, die für die proteolytische Prozessierung der inneren Oozystenwand und somit für die Freisetzung von Sporoziten verantwortlich ist. Das Ortholog von ECP1 bei *P. falciparum* ist SERA-8.

Die Sequenzierung und anschließende Publikation des Genoms von *P. falciparum* (Gardner *et al.*, 2002) lieferte die Grundlage für eine ausgedehnte Studie um bisher unbekannte Proteasen im Genom von *P. falciparum* zu identifizieren (Wu *et al.*, 2003). Die vorausgesagten Proteinsequenzen wurden mit den Proteinsequenzen der MEROPS Proteasen-Datenbank abgeglichen (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Die Studie konnte insgesamt 92 putative Proteasenhomologe identifizieren, unter denen sich ebenfalls die 12 bis dato bei *P. falciparum* bekannten und teilweise funktionell charakterisierten Proteasen befanden. Die bekannten Proteasen umfassten unter anderem Plasmepsin I, II, IV und HAP, Falcipain-1-3, sowie Subtilisin-1 und -2. Anschließende Transkriptom- und Proteomstudien konnten zeigen, dass von den 92 Proteasen 88 aktiv transkribiert und 67 translatiert werden.

1.4.2 Die Anwendung von Protease-Inhibitoren in der Malariaforschung

Drei methodische Strategien werden angewandt, um die Rolle von Proteasen bei *Plasmodium* zu identifizieren: erstens die Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von Proteasen unter Anwendung von z.B. Immunfluoreszenzstudien, zweitens die Analyse von Gen-*Knockout*-Parasiten und drittens die Untersuchung des Effektes von Protease-Inhibitoren auf bestimmte Zellprozesse (Blackman, 2008). Die sequentielle Hämoglobindegradation sowie die Beteiligung von verschiedenen Proteasekategorien an der Merozoiteninvasion wurden durch die Untersuchung des Effektes von Protease-Inhibitoren

Einleitung

auf das asexuelle Parasitenwachstum aufgeklärt (Rosenthal, 1998; Rosenthal, 2001; Greenbaum *et al.*, 2002; Kitjaroenthom *et al.*, 2006). Einige Studien bedienten sich ebenfalls der Anwendung ausgewählter Protease-Inhibitoren, um die Rolle von Proteasen im sexuellen Vermehrungszyklus von *Plasmodium* näher zu beleuchten. So konnte die Beteiligung von einer Cystein- und einer Metalloprotease an der Prozessierung des sexualstadienspezifischen Proteins *Pfs230* im Laufe der Gametogenese postuliert werden (Brooks & Williamson, 2000). Torres *et al.* zeigten unter Einsatz von Protease-Inhibitoren an einer an *P. berghei* durchgeführten Studie, dass Proteasen an der Gametogenese, frühen Zygotenentwicklung sowie Ookinetenbildung involviert sind (2005). Eine weitere Studie konnte mit Hilfe des Cysteinprotease-Inhibitors E-64d zeigen, dass die Cysteinprotease Falcipain-3 möglicherweise und andere Cysteinproteasen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung von der Zygote zur Oozyste einnehmen (Eksi *et al.*, 2007). Kürzlich konnten Czesny *et al.* unter Einsatz des Proteasom-Inhibitors Epoxomicin zeigen, dass die Funktion des Proteasoms in der Gametozytenentwicklung sowie der Oozystenbildung essentiell ist (2009).

Studien konnten darüber hinaus belegen, dass Cysteinprotease-Inhibitoren in *in-vivo*-Experimenten eine starke antimalarielle Wirkung ausüben und unterstreichen damit die Relevanz von Experimenten zur Charakterisierung von Protease-Inhibitoren bei *Plasmodium* (Rosenthal *et al.*, 1993; Semenov *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 1999).

1.4.3 Der Hintergrund der ausgewählten Proteasen

Aus den 92 putativen, neu identifizierten Proteasen von *P. falciparum* (Wu *et al.*, 2003) wurden sechs Proteasen für die nähere Charakterisierung für die vorliegende Arbeit ausgewählt (Tabelle 1.1): die Cysteinproteasen Calpain (MAL13P1.310, Stamm CA, Familie C2), Dipeptidyl-Aminopeptidase 2 (DPAP2 oder DPP2; PFL2290w; Stamm CA, Familie C1), Metacaspase 2 (PF14_0363, Stamm CD, Familie C14), GPI:Protein-Transamidase (oder auch als GPI8 bezeichnet; PF11_0298, Stamm CD, Familie C13), die Aspartatprotease Plasmepsin 6 (PFC0495w; Stamm AA, Familie A1) und die Serinprotease *PfSub3* (PFE0355c; Stamm SB, Familie S8). Die sechs Proteasen wurden nach der Analyse intensiver Transkriptom- und Proteomstudien ausgesucht (Florens *et al.*, 2002; Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). Ein entscheidendes Kriterium bei der Auswahl der Proteasen war deren Transkription und/oder Translation in den Sexualstadien von *P. falciparum*.

Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Proteasen wurden zu Beginn dieser Arbeit der *P.-falciparum*-Gendatenbank entnommen (Aurrecochea *et al.*, 2009; <http://www.plasmodb.org>) und unter Verwendung des *Simple Modular Architecture Research*

Einleitung

Tools (SMART; Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2009; <http://smart.embl-heidelberg.de>) analysiert. In Abbildung 1.7 sind die Lage der Proteasedomänen wie Signalpeptid, Transmembrandomäne und katalytische Domäne für die einzelnen Proteasen dargestellt.

Tabelle 1.1. Für die Studie ausgewählte Proteasen. Die Identifizierungsnummern (ID) sind der MEROPS-Proteasen-Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk>) und der Gendatenbank von *P. falciparum* (<http://www.plasmodb.org>) folgend angegeben.

Name	Stamm	Familie	MEROPS-ID	Gen-ID
Calpain	CA	C2	-	MAL13P1.310
DPAP2	CA	C1	C01.124	PFL2290w
Metacaspase 2	CD	C14	-	PF14_0363
GPI:Protein Transamidase	CD	C13	C13.005	PF11_0298
Plasmepsin 6	AA	A1	A01.058	PFC0495w
<i>PfSub3</i>	SB	S8	S08.122	PFE0355c

Calpain

Calpaine sind in höheren Eukaryoten kalziumabhängige Proteasen, die an einer Vielzahl unterschiedlicher Zellprozesse wie der Signaltransduktion, der Zellmotilität, der Apoptose und der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Sorimachi *et al.*, 1997; Glading *et al.*, 2002; Perrin & Huttenlocher, 2002). Olaya und Wassermann konnten 1991 für *P. falciparum* zeigen, dass die Merozoiteninvasion durch Calpain-Inhibitoren I und II blockiert werden konnte, ohne dass das dazugehörige Gen identifiziert worden war. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Calpain eine N-terminale Kern-Zielsequenz besitzt und im Nukleolus lokalisiert ist (Russo *et al.*, 2009a). Eine andere Studie zeigte unter Anwendung von Protein-*knock-down* Studien, dass Calpain in *P. falciparum* für die Zellzyklusprogression verantwortlich und essentiell in den asexuellen Blutstadien ist (Russo *et al.*, 2009b). Calpain wird in asynchronen, gemischten asexuellen Parasitenkulturen, in synchronen Trophozoiten und Schizonten, Merozoiten, Gametozyten und Sporozoiten transkribiert (Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). Die Proteinexpression von Calpain konnte in Sporozoitenstadien nachgewiesen werden (Rosenthal, 2004).

DPAP2

Dipeptidyl-Amino-peptidasen gehören zu einer Klasse von Exopeptidasen, welche Dipeptide vom aminoterminalen Ende von Peptiden abspalten (Kirschke & Barrett, 1987). Das Genom von *P. falciparum* kodiert für insgesamt drei Dipeptidyl-Amino-peptidasen DPAP1-3. Für DPAP1 konnte eine Beteiligung am Hämoglobinabbau in der Nahrungsvakuole demonstriert werden (Klemba *et al.*, 2004). DPAP3 scheint zusammen mit *PfSub1* an der SERA-Prozessierung beteiligt zu sein (Arastu-Kapur *et al.*, 2008). Über eine Funktion von DPAP2 ist bisher nichts bekannt. DPAP2 wird in Schizonten, Merozoiten, Gametozyten und

Sprozoiten transkribiert (Le Roch *et al.*, 2003). Proteomanalysen wiesen auf eine Translation der Genprodukte in Trophozoiten und Gametozyten hin (Florens *et al.*, 2002).

GPI:Protein Transamidase (GPI8)

Im Genom von *P. falciparum* wurde ein Gen identifiziert, welches putativ für eine Transamidase kodiert, die in einem Proteinkomplex wirkt und Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an neu synthetisierte Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) anfügt (Delorenzi *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). In Protozoen werden auffällig viele Proteine über einen GPI-Anker mit der Parasitenoberfläche verbunden (Mottram *et al.*, 2003). Für Hefe- und Säugerzellen konnte nachgewiesen werden, dass der Protein-Transamidase-Komplex als Kernbestandteil die katalytisch aktive Transamidase (in diesem Zusammenhang oft als GPI8 bezeichnet) besitzt (Orlean & Menon, 2007). Bei *Trypanosoma* wird die von GPI8 katalysierte Reaktion als Angriffspunkt für neue Medikamente gehandelt (Ferguson, 2000). Über die Wirkungsweise der GPI:Protein-Transamidase in *Plasmodium* ist bisher nichts bekannt. GPI8 wird in *Plasmodium* ebenfalls als möglicher Medikamentenangriffspunkt angesehen, da parasitenspezifische Proteine wie PMSP-1, Ps48/45, PCSP, Ps25 und Ps28 GPI-verankert sind und im Lebenszyklus von *Plasmodium* eine wichtige Rolle spielen (Gilson *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die GPI:Protein-Transamidase in Schizonten und Gametozyten transkribiert wird (Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). Proteomanalysen wiesen in Gametozyten die Transamidase GPI8 nach (Florens *et al.*, 2002).

Metacaspase 2

In Vertebraten ist eine Caspasekaskade am programmierten Zelltod beteiligt (Thornberry & Lazebnik, 1998; Aravind *et al.*, 1999). Apoptotische Vorgänge wurden für Protozoen wie *Leishmania* (Zangger *et al.*, 2002; Holzmüller *et al.*, 2006) und *Trypanosoma* (Nguewa *et al.*, 2004; Welburn *et al.*, 2006) nachgewiesen. Eine mögliche Existenz von Apoptose bei *Plasmodium* ist strittig, jedoch konnten apoptotische Elemente in erythrozytären Parasitenstadien von *Plasmodium* und eine Beteiligung der Protease Metacaspase 1 (PMCA1) nachgewiesen werden (Meslin *et al.*, 2007). Das Ortholog bei *P. berghei* (PbMC1) scheint dagegen keine essentielle Rolle im Lebenszyklus dieses Parasiten zu spielen (Le Chat *et al.*, 2007). Das Genom von *P. falciparum* enthält insgesamt zwei Vertreter einer phylogenetisch alten Caspase-Familie: Metacaspase 1 und Metacaspase 2 (Wu *et al.*, 2003; Rosenthal, 2004). Beide gehören der Familie der Metacaspasen an, die neben den Vertretern der Familie der Paracaspasen weitere caspaseähnliche Proteasen umfassen (Uren *et al.*, 2000). Außer in Protozoen wurden Metacaspasen bisher nur in Genomen von Hefe und Pflanzen identifiziert (Wu *et al.*, 2003). Diese Spezifität zeichnet sie als exzellente

Einleitung

Angriffspunkte für Medikamente aus. Über eine mögliche Funktion der Metacaspase 2 bei *Plasmodium* ist bisher nichts bekannt, jedoch konnte eine Transkription des Genes auf mRNA(messenger RNA)-Ebene in Trophozoiten, Schizonten, Merozoiten, Gametozyten und Sporozoiten nachgewiesen werden (Le Roch *et al.*, 2003). Metacaspase 2-Proteine wurden darüber hinaus in Gametozyten gefunden (Florens *et al.*, 2002).

Plasmepsin 6

Das Genom von *P. falciparum* kodiert neben Plasmepsin 6 für insgesamt neun weitere Plasmepsine (Coombs *et al.*, 2001). Plasmepsin 1, 2, 4 und HAP sind in der Nahrungsvakuole lokalisiert und am Hämoglobinabbau beteiligt (Banerjee *et al.*, 2002). *Knockout*-Studien konnten belegen, dass in Abwesenheit von einem oder mehreren dieser Plasmepsine ihre Funktion kompensiert werden kann (Omara-Opyene *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Plasmepsin 5 ist als membrangebundene Protease mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert (Klemba & Goldberg, 2005). Für Plasmepsin 6 wurde transkriptionelle Aktivität in Schizonten, Gametozyten und Sporozoiten nachgewiesen (Le Roch *et al.*, 2003). Auf Proteinebene wurde Plasmepsin 6 in Sporozoiten detektiert (Florens *et al.*, 2002) Über eine subzelluläre Lokalisation oder Funktion von Plasmepsin 6 ist bisher nichts bekannt.

PfSub3

PfSub3 gehört in *P. falciparum* zu einer Gruppe von insgesamt drei Serinproteasen, die als Subtilisin-ähnliche Proteasen bezeichnet werden. Subtilasen übernehmen eine Vielzahl an Funktionen und werden vorwiegend sekretiert (Withers-Martinez *et al.*, 2004). *PfSub1* stellt ein multifunktionales Enzym dar und spielt sowohl beim Merozoitenausbruch aus der Wirtszelle als auch bei der Merozoiteninvasion in die Wirtszelle eine wichtige Rolle (Yeoh *et al.*, 2007; Koussis *et al.*, 2009). *PfSub2* wurde zusammen mit *PfSub1* als die verantwortliche Protease der MSP-Proteinkomplex-Prozessierung auf der Oberfläche des Merozoiten identifiziert (Harris *et al.*, 2005; Koussis *et al.*, 2009). Das Merozoitenoprotein AMA-1 wird ebenfalls von *PfSub2* vor der Erythrozyteninvasion prozessiert, was *PfSub2* die Bezeichnung als 'Sheddase' (von engl. (*to*) *shed* = spalten) verliehen hat (Harris *et al.*, 2005). Für *PfSub3* konnte transkriptionelle Aktivität in Trophozoiten, Schizonten, Merozoiten, Gametozyten und Sporozoiten festgestellt werden (Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003) Darüber hinaus ist nichts über diese Protease bekannt.

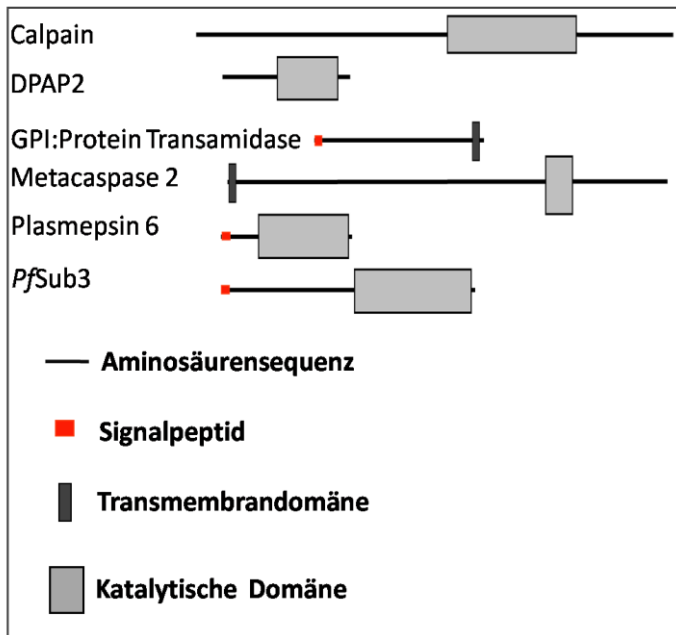


Abbildung 1.7. Schematische Darstellung der für die Studie ausgewählten Proteasen Calpain, DPAP2, GPI:Protein Transamidase, Metacaspase 2, Plasmepsin 6 und PfSub3. Die relative Proteasengröße ist durch die Aminosäuresequenz angegeben. Die Proteindomänen Signalpeptid, Transmembrandomäne und katalytische Domäne wurden mittels SMART-Blast (<http://smart.embl-heidelberg.de>) detektiert und sind für die einzelnen Proteasen dargestellt.

1.5 Neuartige Zell-Zellverbindungen in Eukaryoten

1.5.1 Signalübertragungsarten in mehrzelligen Organismen

Rustom *et al.* publizierten 2004 ihre Entdeckung, dass Säugerzellen extrem lange und dünne Zellverbindungen ausbilden, die den interzellulären Transfer von zytoplasmatischen Komponenten über große Entfernungen gewährleisten können. Diesen Zellverbindungen wurde die Bezeichnung Tunnel-*nanotubes* (TNT, *Tunneling nanotubes*) zugewiesen, und ihre signalvermittelnde Wirkung wird als neue Art der interzellulären Kommunikation diskutiert. Bis dato wurde angenommen, dass in höheren Eukaryoten die humorale Signalübertragung mittels sezernierter chemischer Botenstoffe abläuft (Löffler, 2005). Dabei werden die juxtakrine Signalübertragung zwischen zwei benachbarten Zellen die in direktem Kontakt zueinander stehen (z.B. in der embryonalen Zelldifferenzierung) unterschieden, die parakrine Signalübertragung bei der sich Zellen in kurzen Distanzen zueinander befinden (z.B. bei der synaptischen Übertragung von Neurotransmittern) und die endokrine Signalübertragung bei der signalvermittelnde Moleküle zwischen weit voneinander entfernt liegenden Zellen transportiert werden (z.B. durch die Ausschüttung von Hormonen). Sogenannte *Gap junctions* stellen eine weitere Form der Signalübertragung zwischen zwei benachbarten Zellen dar, bei der ein zytoplasmatisches Kontinuum durch die Ausbildung von kanalbildenden Proteinkomplexen bereitgestellt wird (Kumar & Gilula, 1996; Evans & Martin, 2002).

1.5.2 Neuartig beschriebene Zell-Zellverbindungen

Vorkommen und Entstehung

Lange membranöse Zell-Zellverbindungen sind bereits in einer Vielzahl von Zelltypen unterschiedlicher Organismen sowohl in *in-vitro*-Zellkultursystemen als auch in Gewebe beschrieben worden (Übersichtsartikel Gerdes *et al.*, 2007; Davis & Sowinski, 2008; Gurke *et al.*, 2008), bevor sie durch die Entdeckung des interzellulären Organellentransfers (Rustom *et al.*, 2004) weiter in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses rückten. In Tabelle 1.2 ist eine Zusammenfassung über die wichtigsten im Folgenden beschriebenen Charakteristika und Besonderheiten der unterschiedlichen Zell-Zellverbindungen angegeben. Bei embryonalen Zellen von *Drosophila* und vom Seeigel (*Lytechinus variegatus*) konnten dünne, filopodienähnliche Zellverbindungen nachgewiesen werden, die sich im Laufe der Embryogenese entwickelten und an Signalübertragungsprozessen beteiligt sein könnten (Gustafson & Wolpert, 1967; Karp & Solursh, 1985; Miller *et al.*, 1995; Ramirez-Weber & Kornberg, 1999). Ähnliche membranöse Zellausläufer wurden für eine Vielzahl von immunologisch aktiven Zellen beschrieben, z.B. für Makrophagen (Önfelt *et al.*, 2004; 2006; Eugenin *et al.*, 2009), B-Zellen (Gupta & DeFranco, 2003; Önfelt *et al.*, 2004), natürlichen Killerzellen (Önfelt *et al.*, 2004), T-Zellen (Sowinski *et al.*, 2008; Arkwright *et al.*, in Druck), zytotoxischen T-Zellen (Stinchcombe *et al.*, 2001), Monozyten und dendritischen Zellen (Watkins & Salter, 2005) sowie Neutrophilen (Schmidtke & Diamond, 2000; Galkina *et al.*, 2001; Galkina *et al.*, 2005). Andere Zelltypen, in denen interzelluläre Membrankonnektive beschrieben wurden, umfassen unter anderem Kardiomyozyten (Koyanagi *et al.*, 2005), Nierenzellen (Rustom *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2005), Astrozyten (Zhu *et al.*, 2005) und neuronale Zellen (Rustom *et al.*, 2004; Gousset *et al.*, 2009). Die Vielfalt der unterschiedlichen Zelltypen, bei denen membranöse Zellfilamente beschrieben worden sind, wird ebenso durch die Variation der ihnen zugewiesenen Namen reflektiert. Zunächst als Pseudopodien bezeichnet (Gustafson & Wolpert, 1967), wurden sie später unter anderem als *Cytonemes* (Ramirez-Weber & Kornberg, 1999), Filopodien (Miller *et al.*, 1995), Membranleinen (*'membrane tethers'*; Schmidtke & Diamond, 2000), tubovesikuläre Ausläufer (Galkina *et al.*, 2001), fadenähnliche Projektionen (*'thread-like projections'*; Gupta & DeFranco, 2003), Tunnel-*nanotubes* (TNT; Rustom *et al.*, 2004) oder als Membran-*nanotubes* (Önfelt *et al.*, 2004) bezeichnet.

Für die Entstehung der membranösen Zellfilamente werden bisher zwei Modelle diskutiert: entweder sie werden *de novo* durch eine aktive, aktinabhängige Bewegung gebildet oder sie bleiben nach einem physischen Kontakt zweier Zellkörper zurück (Davis & Sowinski, 2008; Sherer & Mothes 2008). Die aktive Bildung der Zellausläufer erreichte beispielsweise bei

Neutrophilen eine Geschwindigkeit von 40 $\mu\text{m/s}$ (Schmidtke & Diamond, 2000). Ein Einziehen der Zellausläufer ist bisher nicht beschrieben worden.

Morphologie und assoziierte Zellkomponenten

Die bisher beschriebenen membranösen Zellkonnektive (Abbildung 1.8) lassen sich trotz gewisser Variabilität in ihrer Morphologie aufgrund gemeinsamer Charakteristika zusammenfassen (Tabelle 1.2). Grundlegend ist ihnen gemein, dass sie gerade und/oder verzweigte Zellausläufer darstellen, deren Durchmesser im Bereich zwischen 50 und 800 nm und Länge zwischen 10 und 140 μm liegt (Miller *et al.*, 1995; Önfelt *et al.*, 2004; Rustom *et al.*, 2004; Koyanagi *et al.*, 2005; Sherer *et al.*, 2007; Sowinski *et al.*, 2008; Gousset *et al.*, 2009). Sie werden als fragile Zellverbindungen beschrieben, die leicht durch chemische Fixierungsarten, mechanische Einwirkung und Lichtreizung zerstörbar sind (Rustom *et al.*, 2004). Entlang der Zellverbindungen wurden beulenartige Membranauswölbungen beobachtet (Miller *et al.*, 1995; Galkina *et al.*, 2001; Raghunathan *et al.*, 2001; Önfelt *et al.*, 2004; Rustom *et al.*, 2004). Rustom *et al.* postulierten ein Membrankontinuum mit nahtlosem Übergang der Membranen von einer zur anderen Zelle (2004), während Sowinski *et al.* die Zellverbindungen als am Ende geschlossen darstellen konnten (2008). Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist seither, ob es sich bei den membranösen Zellausläufern um tubuläre, am Ende offene Verbindungen oder am Ende geschlossene interzelluläre Brücken handelt (Sherer & Mothes 2008). Unterschiede herrschen auch bezüglich der Dauer der Exposition der Zellfilamente, die von Minuten (Önfelt *et al.*, 2004) bis zu mehreren Stunden variiert (Lehmann *et al.*, 2005; Önfelt *et al.*, 2006; Sherer *et al.*, 2007). Mit Ausnahme von zwei Studien, die die Beteiligung von Mikrotubuli an membranösen Zellausläufern postulieren (Gustafson & Wolpert, 1967; Önfelt *et al.*, 2006), weisen die Ergebnisse der übrigen Studien bezüglich der beteiligten Zytoskelettkomponenten auf eine Assoziation von Aktin mit den Zellfilamenten hin (Miller *et al.*, 1995; Rustom *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2005; Önfelt *et al.*, 2006; Sherer *et al.*, 2007; Sowinski *et al.*, 2008; Bukoreshtliev *et al.*, 2009). Die interzelluläre Verbreitung von Zellmaterial durch membranöse Zellverbindungen, entweder als Komponenten der Plasmamembran oder des Zytoplasmas, konnte mehrfach demonstriert werden. Der Transport von Mitochondrien (Koyanagi *et al.*, 2005; Önfelt *et al.*, 2006), endosomalen bzw. lysosomalen Vesikeln (Rustom *et al.*, 2004; Önfelt *et al.*, 2006), fluoreszenzmarkierten Lipiden und Proteinen (Önfelt *et al.*, 2004; Watkins & Salter, 2005) sowie aktiven Caspasen (Arkwright *et al.*, in Druck) wurde nachgewiesen. Önfelt *et al.* demonstrierten, dass der beobachtete Transport mittels zweier unterschiedlicher Typen von tubulären Zellverbindungen erfolgt: in dicken Membran-*nanotubes* mit einem Durchmesser größer als 700 nm oder in dünnen Membran-*nanotubes* mit einem Durchmesser zwischen 35 und 250 nm (2006). Bisher wird ein ATP-abhängiger Transportmechanismus angenommen

Einleitung

(Önfelt *et al.*, 2006), der weiterhin F-Aktin und Myosin benötigt (Rustom *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005) und entweder unidirektional (Rustom *et al.*, 2004) oder bidirektional (Önfelt *et al.*, 2006) erfolgt. Watkins & Salter konnten mittels Einsatz eines fluoreszierenden Kalziumindikators belegen, dass Kalziumionen unidirektional von Tunnel-*nanotubes* übertragen werden können (2005).

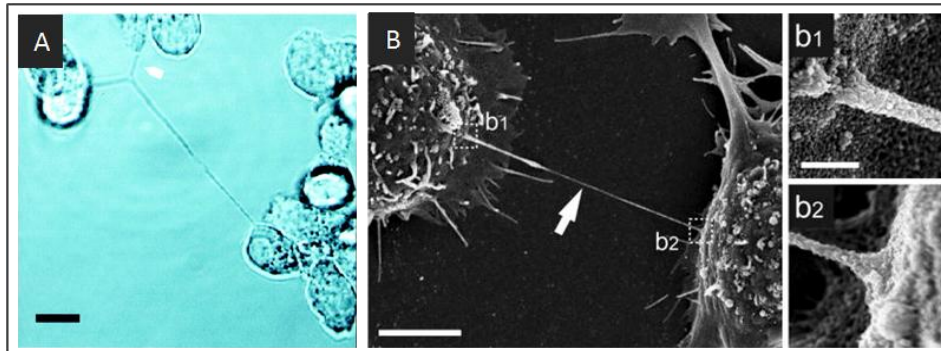


Abbildung 1.8. Neuartige Zell-Zellverbindungen in Säugerzellen. **A.** Membran-*nanotubes* bilden über eine Distanz von ca. 80 μm ein Netzwerk und verbinden drei Makrophagen miteinander. Konfokale-Laser-Raster-Mikroskopie-Aufnahme; Größenangabe, 10 μm . **B.** Neuronale Zellen werden über Tunnel-*nanotubes* miteinander verbunden, deren Membranen nahtlos von Zelle zu Zelle ineinander übergehen. **b1,b2.** Vergrößerte Aufnahme der Tunnel-*nanotubes* in der Nähe des Austritts aus den Zellkörpern. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme; Größenangabe, B, 5 μm ; b1 und b2, 500 nm.⁶

Zellausläufer als Mechanismus der Pathogenverbreitung

Die Ausbildung von membranösen Zellverbindungen kann von Pathogenen für die Verbreitung von Wirtszelle zu Wirtszelle ausgenutzt werden (Sherer & Mothes 2008). Es konnte beschrieben werden, wie die Zellinvasion von Viren und deren interzellulärer Transfer entlang von filopodienähnlichen Zellausläufern beschleunigt wird (Lehmann *et al.*, 2005; Sherer *et al.*, 2007). Die Wanderung von Bakterien entlang von dünnen Makrophagenverbindenden Zellverbindungen konnte ebenso demonstriert werden (Önfelt *et al.*, 2006). Weiterhin konnten Studien belegen, dass membranöse Zellausläufer sowohl die Verbreitung von HIV-Partikeln zwischen T-Zellen bzw. Makrophagen ermöglichen (Sowinski *et al.*, 2008; Eugenin *et al.*, 2009), als auch den Prionen-Transfer (PrP^{Sc}) zwischen Neuronen und Neuronen sowie zwischen dendritischen Zellen und Neuronen vermitteln (Gousset *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Tunnel-*nanotube*-ähnlichen Transportkanälen in Pflanzen- und Insektenzellen nach Virusinfektionen induziert werden kann (Kasteel *et al.*, 1996). Die Induktion dieser Transporttubuli ermöglicht ebenfalls die interzelluläre Verbreitung der Viruspartikel und ist zurückzuführen auf die Expression von viralen Bewegungsproteinen (*movement proteins*). Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei einer Infektion von *Listeria monocytogenes* ablaufen, bei der die Verbreitung der Bakterien

unter anderem über die Bildung von tubulären Wirtszellausläufern erfolgt (Robbins *et al.*, 1999).

Postulierte Funktionen

Die Beschreibung von membranösen Zellausläufern in embryonalen Zellen legte bereits die Vermutung auf deren Beteiligung in der Sensorik und an Signalübertragungsprozessen nahe (Miller *et al.*, 1995; Ramirez-Weber & Kornberg, 1999; Hsiung *et al.*, 2005). Besonders durch die Erforschung des Organellentransfers mittels membranöser Zellausläufer wurde die Annahme gestützt, dass sie eine neue Art der interzellulären Kommunikation darstellen (Gupta & DeFranco, 2003; Önfelt *et al.*, 2004; Rustom *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2005; Watkins & Salter, 2005; Önfelt *et al.*, 2006; Sherer *et al.*, 2007). Koyanagi *et al.* stellten die Hypothese auf, dass die beschriebenen Zellverbindungen eine neuentdeckte Art der Entwicklung von Hybridzellen darstellt, durch welche Zellen in ihrer Differenzierung umprogrammiert werden können (2005). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass membranöse Zellausläufer in T-Zellen Apoptosesignale weiterleiten können (Arkwright *et al.*, in Druck). Neutrophilenzellausläufer veranlassten Forscher zur Formulierung der Annahme, dass sie im immunologischen *Rolling* involviert sind und damit zusätzlich weit entfernte Objekte zur Phagozytose an sich heran ziehen können (Schmidtke & Diamond, 2000; Galkina *et al.*, 2005). Eine ähnliche Funktion wurde Zellausläufern von dendritischen Zellen zugewiesen, die dadurch die Effizienz, eine passende T-Zelle zur Antigenpräsentation zu lokalisieren, steigern könnten (Raghunathan *et al.*, 2001).

Tabelle 1.2. Zusammenfassung der wichtigsten Charakteristika der bisher in der Literatur beschriebenen membranösen Zellausläufer.

Morphologie	Cargo und Transport	Besonderheit	Mögliche Funktionen
<p>Ø zwischen 50-800 nm und Länge zwischen 10-140 µm</p> <p>verzweigt oder nicht verzweigt</p> <p>durchgängiges Membrankontinuum und am Ende offen oder am Ende geschlossen</p> <p>in periodischen Abständen von beulenartigen Auswölbungen unterbrochen oder glatte Oberfläche</p>	<p>Mitochondrien, endosomale und lysosomale Vesikel, lösliche zytoplasmatische und nicht-lösliche membranassoziierte Komponenten,</p> <p>Kalziumionen</p> <p>Viren, Bakterien, Prionen</p> <p>unidirektional oder bidirektional</p> <p>ATP-abhängig</p>	<p>meistens Aktin-assoziiert, in seltenen Fällen auch mit Mikrotubuli verbunden</p> <p>Bildung <i>de novo</i> oder nach physikalischem Zellkontakt</p> <p>robust und beständig oder sehr sensibel</p> <p>Exposition von Minuten bis Stunden</p>	<p>Signalübertragungsprozesse und interzelluläre Kommunikation</p> <p>neue Art der Entwicklung von Hybridzellen</p> <p>Herstellung eines physikalischen Zellkontaktes</p>

1.6 Das Ziel der Arbeit

Eine jährliche Malariamortalitätsrate von über einer Million Menschen sowie rapide wachsende Resistenzen von *Plasmodium* gegen bestehende Therapiemöglichkeiten erhöhen den Druck auf die Entwicklung neuer Medikamente und eines Impfstoffes. Im Zuge dessen rückt die Erforschung der Sexualphase der Malariaerreger immer weiter in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses, um Kandidaten für transmissionsblockierende Medikamente und Vakzine zu identifizieren. Die Inhibierung essentieller Prozesse in der Gametozyten- und Gametenbildung von *Plasmodium* würde den Lebenszyklus unterbrechen und damit die Verbreitung der Malaria unterbinden. Eine Voraussetzung dafür stellt die grundlegende Erforschung der Sexualphase und das Verständnis der daran beteiligten Ereignisse dar. Als ein exzellenter Angriffspunkt neuer Medikamente werden die im Genom von *P. falciparum* kodierten Proteasen gehandelt, von denen bisher nur ein Bruchteil charakterisiert worden ist. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Identifizierung von Proteasen die an der Gametogenese von *P. falciparum* beteiligt sind. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Charakterisierung neu entdeckter Gametenfilamente die während Befruchtungsvorgängen von *P. falciparum* auftreten, um deren Bedeutung in der Fertilisation benennen zu können. Die Beschreibung ähnlicher Zell-Zellverbindungen in Säugern und Invertebraten lässt darauf schließen, dass sie dort ein neuartiges Prinzip der interzellulären Signalvermittlung darstellen. Beide Themengebiete der vorliegenden Arbeit zielten darauf ab, die Sexualphase von *Plasmodium* detailliert zu beleuchten, um an der Gametenbildung und Befruchtung beteiligte und bisher unbekannte essentielle Komponenten zu identifizieren.

Ein wichtiger Bestandteil bei der Erforschung von *Plasmodium*-Proteasen stellte die Untersuchung der Wirkung ausgewählter Protease-Inhibitoren auf die Exflagellation männlicher Gameten dar. Für die Zielproteasen einer dieser Inhibitoren sollte mittels Immunfluoreszenz die subzelluläre Lokalisation innerhalb des Parasiten ermittelt werden. Zusätzlich dazu sollten sechs ausgewählte, bisher nicht charakterisierte Proteasen hinsichtlich ihrer Expression und Funktion in den Sexualstadien untersucht werden. RT-PCR-Analysen sollten durchgeführt werden, um erste Anhaltspunkte über die Transkription der Proteasen zu erhalten. Die Generierung von rekombinantem Protein im bakteriellen System sowie die Gewinnung von Immunsereum sollte die Grundlage von Expressions- und Lokalisationsanalysen anhand von Western-Blot-Studien und Immunfluoreszenz-Experimenten darstellen. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung von Gen-*knockout*-Parasiten zur Funktionsanalyse der Proteasen.

Die Aufgabe der Charakterisierung neu entdeckter Gametenfilamente umfasste deren morphologische Beschreibung und die Aufklärung ihrer Bedeutung während der Fertilisation.

Einleitung

filamentassoziierte Proteine sollten identifiziert und deren Rolle in der Filamentbildung durch die Analyse von vorhandenen Gen-*knockout*-Parasitenlinien untersucht werden. Rasterelektronenmikroskopische Experimente stellen einen wesentlichen Aspekt der Untersuchung der Filamentmorphologie dar. Der Zeitpunkt der Filamentbildung sollte bestimmt und die Zusammensetzung der Filamentmembran aufgeklärt werden. Es galt weiterhin, Anhaltspunkte über assoziierte Zytoskelettkomponenten und ihre Rolle in der Filamententwicklung zu erhalten. Dabei sollten spezifische Inhibitoren und Immunfluoreszenzstudien zur Anwendung kommen. *Live-imaging*-Experimente unter Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen und einer das grün fluoreszierende Protein-exprimierenden Parasitenlinie sollten die Charakterisierung abrunden und die Bedeutung der Filamente aufklären. Zusätzlich zur Erforschung der Gametenfilamente *in vitro* sollte deren Vorkommen *in vivo* zur Funktionsanalyse durch die Untersuchung des Mitteldarminhaltes von infizierten Stechmücken dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1. Verwendete Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
AccuJet pro [®]	Brand, Wertheim
Autoklav FOMI B 50	Fedegari, Albuzzano, Italien
Brutschrank Modell 100-800	Memmert, Schwabach
Bunsenbrenner Gasi	Schütt, Göttingen
Chromatographiesäulen PolyPrep [®]	Bio-Rad, München
Digitalkamera IXUS	Canon
Drucker LaserJet 1200	Hewlett Packard, Böblingen
Druckkammer CDP 030	BAL-TEC
Elektronenmikroskop EM10	Zeiss, Oberkochen
Elektrophoresekammer MIDI 1, MAXI	Roth, Karlsruhe
Elektrophoresekammer Mini-Protean 3	Bio-Rad, München
Feinwaage GR-200	A & D, Ahrensburg
Fluoreszenzmikroskop Axiolab HBO 50/AC	Zeiss, Oberkochen
<i>French Pressure cell press</i> SIM AMINCO	SLM instruments, New York, USA
Geldokumentation Gel Doc 2000	Bio-Rad, München
Geltrocknungsrahmen 14 x 14 cm	Roth, Karlsruhe
Heizblock Bio TBD-100, TBD-120	Lab-4you, Berlin
Inkubator HERAcell	Heraeus, Hanau
Kanülen Sterican	Braun, Melsungen
Klimakammer	Genheimer, Höchberg
Küvette Elektroporation	Fisher BioRAD
Konfokales Laserrastermikroskop LSM 510	Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop Leica DMLS	Leica, Solms
Lichtmikroskop Leitz Laborlux 11	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer	Marienfeld, Mergentheim
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
PCR-Thermocycler primus 25 advanced	Peq-Lab, Erlangen
pH-Meter	InoLab, Weilheim
Pipettensatz <i>Research</i>	Eppendorf, Hamburg
Quarzküvette 1000	Roth, Karlsruhe
Präzisionswaagen 440-47N und 440-33	Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Rasterelektronenmikroskop Zeiss DSM 962	Zeiss, Oberkochen
Rotator-Mixer	Labinco, DG Breda, Niederlande
Scanner Perfection 4990 Photo	Epson, Meerbusch
Schüttler SM 30 control	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Spritzenfilter 0,2 µm	Roth, Karlsruhe
<i>Sputter</i> Gerät: SCD 005	BAL TEC
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Hanau
Sterilfilter Steritop™ 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Stromquelle PowerPac HC	Bio-Rad, München
Stromquelle E 835	Consort, Thumhout, Belgien
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Transmissionselektronenmikroskop EM 10	Zeiss, Oberkochen
Spektrophotometer	Amersham Bioscience, München
Vakuumpumpe Laboport	KNF, Freiburg
Vortexer L46	Lab-Tek, Christchurch, Neuseeland
Waagen 440-47N und 440-33	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wärmeplatten OTS 40	medite, Burgdorf
Wasseraufbereitungssystem TKA LAB HP Typ 08.2203	TKA, Niederelbert

Wasseraufbereitungssystem Milli-Q <i>Ultrapure Purification Systems</i>	Millipore
Wasserbadinkubator Hecht 3185 WTE	Karl Hecht KG, Sondheim
Wasserbadinkubator Typ WB20	PD Industriegesellschaft, Dresden
Western Blot Apparatur	Bio-Rad, München
Wippe Mini-Rocker MR1	Lab-4you, Berlin
Zeiss Axiovert200/Axiovision 4.3 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Falcon, Heidelberg
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

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

Einwegmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

BD Falcon, Heidelberg
 Bio-Rad, München
 Eppendorf, Hamburg
 Greiner, Flacht
 Hartenstein, Würzburg
 Millipore, Schwalbach
 Noras, Höchberg
 Provac, Oestrich-Winkel
 Roth, Karlsruhe
 Sarstedt, Nümbrecht

- Erythrozytenkonzentrat und humanes Serum der Blutgruppe A+ für die Zellkultur vom Bayerischen Roten Kreuz, Würzburg

Material und Methoden

- Weibliche, sechs Wochen alte NMRI-Mäuse von Charles River, Sulzfeld
- Zellkulturgas 5 % O₂ Typ 2.5, 5 % CO₂ Typ 2.5 in Stickstoff Typ 3.5 von Tyczka Industriegase, Würzburg
- Zellkulturmedium RPMI 1640 + 25 mM Hepes + L-Glutamin + Natriumbicarbonat von Invitrogen/Gibco, Karlsruhe

2.1.3 Laborkits, Enzyme, Größenstandards

Folgende Kits wurden verwendet:

- *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*; Applied Biosystems, Darmstadt
- *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
- *QIAGEN RNase free DNase Kit*; Qiagen, Hilden
- *SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR*; Invitrogen, Karlsruhe

Enzyme und Größenstandards wurden von folgenden Firmen bezogen:

Invitrogen, Karlsruhe

MBI/Fermentas, St. Leon-Rot

New England Biolabs (NEB), Frankfurt

Qiagen, Hilden

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.2. Verwendete Puffer und Lösungen.

Aktivierungslösung 1	100 µM Xanthurensäure 1.67 mg/ml Glukose 8 mg/ml NaCl 8 mM Tris-Cl pH 8,2
Aktivierungslösung 2	1 X PBS pH 9,5 100 µM Xanthurensäure
1000 x Ampicillin (0,3 M)	100 mg/ml in ddH ₂ O
5% Acrylamid-Sammelgel (Angaben für 2 Gele)	0,6 ml 30% Acrylamid 1,0 ml 0,5 M Tris pH 6,8 12 µl 10% SDS 12 µl 10% APS 4 µl TEMED 2,4 ml ddH ₂ O
10% Acrylamid-Trenngel (Angaben für 2 Gele)	3,3ml 30% Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10% SDS 100 µl 10% APS 4 µl TEMED 4,0 ml ddH ₂ O
12% Acrylamid-Trenngel (Angaben für 2 Gele)	4,0 ml 30% Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10% SDS 100 µl 10% APS 4 µl TEMED 3,3 ml ddH ₂ O
14% Acrylamid-Trenngel (Angaben für 2 Gele)	4,6 ml 30% Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10% SDS 100 µl 10% APS 4 µl TEMED 2,6 ml ddH ₂ O
Cytomix-Puffer (Wu <i>et al.</i> , 1995)	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 2 mM EGTA pH 7,6 5 mM MgCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,6 10 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,6 25 mM Hepes pH 7,6 ad 50 ml ddH ₂ O auf pH 7,6 einstellen
Elutionspuffer Proteinaufreinigung	20 mM Tris pH 7,1 200 mM NaCl 1mM EDTA 10 mM Maltose
Equilibrierungspuffer	12,1 g Tris 5,8 g NaCl 10,2 g MgCl ₂ ad 1l ddH ₂ O pH9,5
1000 x Hypoxanthin (0,4M)	50 mg/ml in ddH ₂ O
1000 x Gentamycin (0,1M)	50 mg/ml in ddH ₂ O
Giemsa-Lösung	1:25 Vol. Giemsa:ddH ₂ O
<i>Glycerolyte 57</i>	300 mg KCl 517 mg Na ₂ PO ₄ Monohydrat, monobasisch 1242 mg Na ₂ PO ₄ Anhydrat, dibasisch

Material und Methoden

IFA-Inkubationslösung	1 x PBS pH 7,4 0,5 % BSA 0,01 % Saponin
Lysepuffer Proteinaufreinigung	50 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA 100 mM NaCl
Lysozymlösung	10 mg/ml in ddH ₂ O
Malstat-Reagenz	2ml 10 % Triton-X-100 2 g L-Lactat 0,66 g Tris 66 mg APAD ad 200 ml ddH ₂ O pH 9,0
NBT/Diaphorase-Mischung	1 mg NBT 1 mg Diaphorase 2 ml ddH ₂ O
1 x NETT-Puffer	0,5 % Triton X 100 5 mM EDTA 50 mM Tris pH 7,5 0,15 M NaCl
10 x SDS-PAGE-Laufpuffer	29 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS ad 1 l ddH ₂ O
10 x PBS	10,6 g Na ₂ HPO ₄ 3,9 g NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 85,5 g NaCl ad 1 l MQH ₂ O pH 7,4
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure
2 x Probenpuffer	2,5 ml 500 mM Tris-HCl pH 6,8 2 ml Glycerin 4 ml 10% SDS 0,5 ml 0,1% Bromphenolblau ad 10 ml ddH ₂ O
Pyrimethaminlösung (250 µg/ml)	15 mg Pyrimethamin in 500 µl DMSO lösen bei 37°C, 83 µl Pyrimethamin/DMSO in 10 ml RPMI <i>incomplete</i> lösen
Stopp-Puffer	1,2 g Tris 0,4 g EDTA ad 1 l ddH ₂ O pH 8
10 x RPMI <i>incomplete</i>	0,05 g Hypoxanthin 5,94 g HEPES 10,43 g RPMI 1640 ad 100 ml ddH ₂ O
50 x TAE-Puffer:	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
1 x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA
10 x TBS	12,1 g Tris 87,3 g NaCl ad 1 l ddH ₂ O pH 7,5
TBSM	1 x TBS 3-5 % Milchpulver
Transferpuffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol ad 1 l ddH ₂ O

Waschpuffer Proteinaufreinigung	20 mM Tris pH 7,1 200 mM NaCl 1mM EDTA
Western-Blot-Blockierungslösung	1 x TBS 5 % Milchpulver 1 % BSA (Fraktion V Albumin)
1 mM Xanthurensäure	50 mg/ml Xanthurensäure in 0,5 M Ammoniumhydroxid gelöst, mit ddH ₂ O verdünnt

2.1.5 Medien

Tabelle 2.3. Verwendete Medien (Lösungen für die *P. falciparum*-Zellkultur wurden immer steril filtriert).

Humanes A ⁺ -Serum	in 50-ml-Reaktionsgefäße aliquotieren, und im Wasserbad bei 55 °C für 50 Minuten hitzeinaktivieren. Lagerung bei -20 °C
A ⁺ -Erythrozyten (50% Hämatokrit)	Erythrozytenkonzentrat zu je 30 ml aliquotieren, 10 Minuten mit 1300 g zentrifugieren; Überstand verwerfen, ad 50 ml mit RPMI- <i>incomplete</i> und zentrifugieren (3x); Erythrozyten 1:1 in RPMI- <i>incomplete</i> aufnehmen und maximal 4 Wochen bei 4 °C lagern
LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar ad 1 l ddH ₂ O Autoklavieren und Antibiotika zugeben, wenn Lösung ≤ 50 °C
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l ddH ₂ O
1 x RPMI <i>incomplete</i>	10,43 g RPMI-1640-Pulver 5,94 g HEPES 0,05 g Hypoxanthin ad 1000 ml H ₂ O
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml 0,25 M KCl 5 ml 2 M MgCl ₂ 20 ml 1 M Glucose ad 1 l H ₂ O
500 ng/ml Pyrimethaminselektionsmedium für <i>P. falciparum</i> -KO-Parasiten	50 ml Zellkulturmedium für Wildtypparasiten 100 µl Pyrimethaminlösung
100 ng/ml Pyrimethaminselektionsmedium für <i>P. falciparum</i> -KO-Parasiten	50 ml Zellkulturmedium für Wildtypparasiten 20 µl Pyrimethaminlösung
15 ng/ml Pyrimethaminselektionsmedium für <i>P. falciparum</i> -KO-Parasiten	50 ml Zellkulturmedium für Wildtypparasiten 3 µl Pyrimethaminlösung
Zellkulturmedium für Wildtypparasiten von <i>P. falciparum</i>	500 ml RPMI 1640 + 25 mM HEPES + L-Glutamin + Natriumbicarbonat 50 ml humanes A ⁺ -Serum 550 µl je 1000 x Hypoxanthin und Gentamycin

2.1.6 Zelllinien, Bakterienstämme und Stechmücken

Verwendete *P.-falciparum*-Zelllinien:

- Wildtyp NF54; Pyrimethamin-sensitiv (Ponnudurai *et al.*, 1981)
- F12; Klon aus dem Klon 3D7 aus dem Isolat NF54 (Alano *et al.*, 1995); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. P. Alano, Rom
- PfCCp1-KO (Simon *et al.*, 2009); PfCCp2- und PfCCp3-KO (Pradel *et al.*, 2004); PfCCp4-KO (Scholz *et al.*, 2008)
- Pfs230-KO, diese Zelllinie produziert besonders viele Gametozyten (Prof. Dr. K.C. Williamson, unveröffentlichte Ergebnisse), und basiert auf dem genetischen Hintergrund der Pfs230-KO-Mutante D1 (Eksi *et al.*, 2002); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. K.C. Williamson, Loyola University, Chicago
- Pfs48/45-KO (van Dijk *et al.*, 2001); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R.W. Sauerwein, Radboud University, Nijmegen
- 5'CAM.GFP; GFP-exprimierende Parasitenlinie (Eksi *et al.*, 2008); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. K.C. Williamson, Loyola University; Chicago

Verwendete *E.coli* Bakterienstämme:

- Proteinexpressionszellen BL21-CodonPlus[®]-(DE3)-RIL (Stratagene); Genotyp *E. coli* OneShot[®]-Top10-Competent-Cells B F⁻ ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]
- Transformationszellen (Invitrogen); Genotyp F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

Verwendete Stechmückenlinie

- *Anopheles stephensi* SxK Nij

2.1.7 Plasmide

KO-Vektorkonstrukt pDT_Tg23

Der Vektor pDT_Tg23 wurde in der Herstellung von *P. falciparum*-KO-Parasiten mittels homologer *single-crossover*-Rekombination eingesetzt (Wu *et al.*, 1996). Basierend auf dem Vektor pBluescript-II-SK von Stratagene kodiert der Vektor zusätzlich für die 5' und 3' gelegenen untranslatierten Sequenzen (*untranslated region*, UTR) des histonreichen Proteins 2 (*hrp2*) und 3 (*hrp3*; Abbildung 2.1A). Die Selektionskassette mit dem mutierten *Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase* (*DHFR-TS*)-Gen aus *Toxoplasma gondii* (Donald & Roos, 1993) verleiht damit transformierten Parasiten Resistenz gegenüber Pyrimethamin. Das *DHFR-TS*-Gen steht somit unter der Kontrolle der 5' und 3' UTR der Proteine *hrp3* bzw. *hrp2*, für die eine erfolgreiche Expression des Reportergens nachgewiesen werden konnte (Wu *et al.*, 1995)

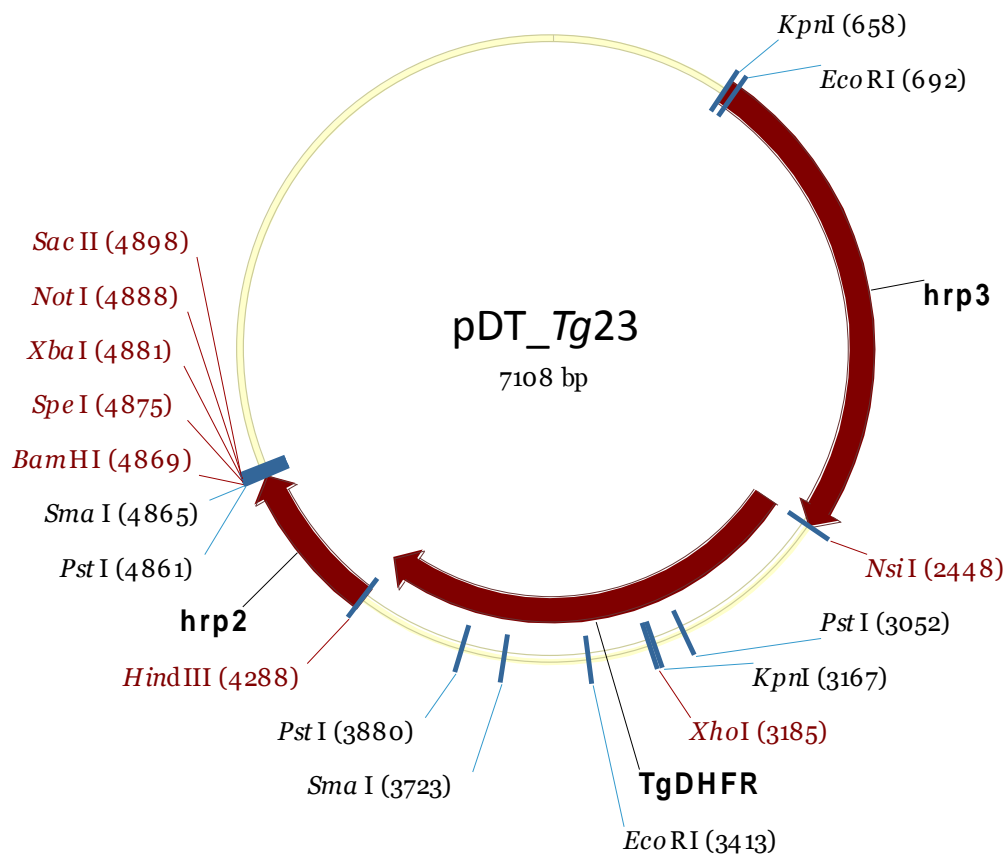


Abbildung 2.1A. Das verwendete KO-Vektorkonstrukt pDT_Tg23 (Wu *et al.*, 1996).

Expressionskonstrukt pIH902

Der Vektor pIH902 ist ein Vorläufer des später entwickelten Expressionskonstruktes pMAL-c und dessen Derivate von New England Biolabs (Maina *et al.*, 1988). Der Vektor wurde von Frau Prof. Dr. K.C. Williamson, Chicago, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das *malE* Gen kodiert für das Maltose-Binde-Protein (MBP) und befindet sich vor dem Polylinker, in den die gewünschte Gensequenz eingesetzt werden kann. Das resultierende Fusionsprotein kann nach Expression nicht vom MBP-Protein abgespalten werden. Zwischen den Restriktionschnittstellen *Sall* und *PstI* befindet sich zusätzlich die Sequenz für ein 6-His-Peptid, kodierend für sechs Histidin-Aminosäuren. Hinter dem Polylinker befindet sich das *lacZ* α -Gen, welches für das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase kodiert und eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht. Das *LacI* Gen kodiert für den Repressor des *lac*-Operons. Im gewählten Expressionssystem erfolgt nach Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiagalactopyranosid (IPTG), welches den *lac*-Repressor bindet, die Proteinexpression (Abbildung 2.1B).

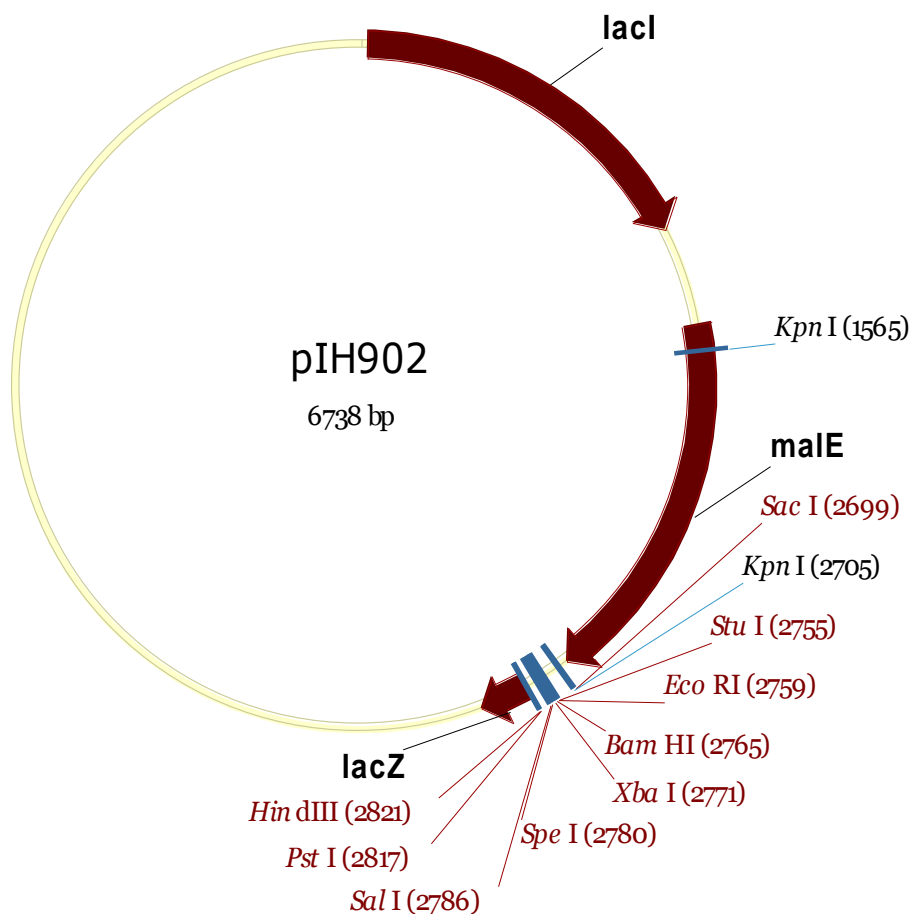


Abbildung 2.1B. Das verwendete Expressionskonstrukt pIH902 (Maina et al., 1988).

2.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 2.4. Verwendete Oligonukleotide.

Gen	Name, Orientierung und Restriktionsschnittstelle	Sequenz
RT-PCR-Analyse		
DPAP2	DPAP-for2 S	ACACAAACGCACCTGAGG
	DPAP-rev2 A	GATGAGACAATCTAGGCA
Calpain	Cal-for1 S	GTTGCGTACAATCCTCAA
	Cal-rev1 A	TGCATGCACATGTAAAGC
GPI8	GP-for1 S	GATAGGTAAGCACGTGGA
	GP-rev1 A	CTTATCCATAGTATCACCG
Meta-caspase 2	Meta-for1 S	CCAACAGAGCGGTTGTAA
	Meta-rev1 A	CCTTAACGTCGAAAGAAG
Plasmepsin 6	Plas-for2 S	GTCAGGTGCAATTACCTT
	Plas-rev2 A	CCTGTATCAATTGCAGCT
PfSub3	Sub3-for2 S	GCTAGTACTACACATTACC
	Sub3-rev2 A	TGCTGAATAAGCAGCTGG
PfAMA-1	PfAMA-1 RT1 S	GGATTATGGGTCGATGGA
	PfAMA-1 RT1 A	GATCATACTAGCGTTCTT
Plasmepsin 1	Plas1-for1 S	GGAGAAGCTCAAATTGGA
	Plas1-rev1 A	GCTTACTGTTCCAGATAC
PfCCp1	PfCCp1 RT1 S	GAAGATGGAGATGGGAAA
	PfCCp1 RT1 A	GCTGTTCAAATTTCCATC
Pfs25	Pfs25 RT2 S	CCATGTGGAGATTTTTCC
	Pfs25 RT1 A	GCATTTGGTTTCTCC
Herstellung von KO-Parasiten		
Calpain	CalpKOfor, S, SacII	AT CCGCGG GACAATTCCAAAGAAAGG
	CalpKOrev, A, NotI	TA GCGGCCGC TTA CGTAAATACATCATGAGC
	CalpINTfor, S, WT1	GTGGGTAATAAGAATGTA
	CalpINTrev, A, WT2	CTGATATATGACTAGGCA
GPI8	Gp18KOfor, S, SacII	AT CCGCGG TTTCTATCGTGGGCGAAA
	Gp18KOrev, A, NotI	TA GCGGCCGC TTA ACCATGTCCGGTCCATATA
	Gp18pINTfor, S, WT1	ATGGGGATAAAAATTATA
	Gp18pINTrev, A, WT2	ATATCCTTGACACGTATC
Meta-caspase 2	MetaKOfor, S, SacII	AT CCGCGG CAGAAAAGCAGATGCTT
	MetaKOrev, A, NotI	TA GCGGCCGC TTA CATATCAGCTGACCTTTG
	MetaINTfor, S, WT1	AATGATAGAAACGAATCT
	MetaINTrev, A, WT2	AAGCCCTTCTTGTTTACT
Plasmepsin 6	PlasmKOfor3, S, SacII	AT CCGCGG TCCCATCAACGAAATGTATC
	PlasmKOrev3, A, NotI	TA GCGGCCGC TTA TGCTTGTTCTGTGCCATA
	PlasmINTfor, S, WT1	GTAGGAAATCCACCTCAAGTATTT
	PlasmINTrev, A, WT2	ATATGATTGTTCAAGGACTTGATA
PfSub3	PfSUBKOfor, S, SacII	AT CCGCGG AGGTGGTGATAAGGAAGA
	PfSUBKOrev, A, NotI	TA GCGGCCGC TTA CATTTGTACCGTATGACT
	SUB3INTFOR2,S, WT1	ATGATAAATAGACAGTATTTTATT
	SUB3INTREV, A, WT2	AGATACATTCGGCAGATC
Herstellung von rekombinantem Protein		
PfSub3	SUB3RPFOR6, S, BamHI	AT GGATCC ATTGAAAAGTGATAATATTGATGGT
	SUB3RPREV3, A, PstI	TA CTGCAG TATATCGCTAATATAACCAGC
Sonstige		
Vektor pDT_Tg 23	M13R, Ep1	GGAAACAGCTATGACCATG
Vektor pDT_Tg 23	T3R, Ep1	TTAACCCCTCACTAAAGGG

Gen	Name, Orientierung und Restriktionsschnittstelle	Sequenz
Vektor pDT_Tg 23	PBS1R	TACGCCAAGCGCGCAATT
Vektor pDT_Tg 23	Hrp2 sense, Ep2	CAATATGAACATAAAGTACAAC
Vektor pH902	MBP Oligo	GGTCGTCAGACTGTTCGATGAAGCC

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'→ 3'-Richtung angegeben; fett gedruckt sind Stopp-Codons und Restriktionsschnittstellen. Die Abkürzungen WT1/2 und Ep1/2 entsprechen den Oligonukleotiden aus Abbildung 2.3. S, Sense-Orientierung; A, Antisense-Orientierung.

2.1.9 DNA-und Proteingrößenstandard

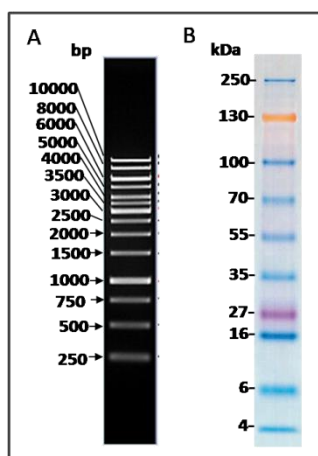


Abbildung 2.2. Verwendeter DNA-Molekulargewichtsstandard und Proteinmarker. **A.** GeneRuler-1-kb-DNA-Leiter von MBI/Fermentas. **B.** SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard von Invitrogen. Die offenkundigen molekularen Größen der Proteinbanden können je nach verwendetem Puffersystem variieren. Bp, Basenpaare; kDa, Kilodalton.

2.1.10 Protease-und Zytoskelett-Inhibitoren

Folgende Protease-Inhibitoren wurden für die Arbeit verwendet, deren Eigenschaften in Tabelle 2.5A zusammengefasst sind: Antipain (Antipain Dihydrochlorid); bADA (biotinyliertes Dibenzyl-aziridin-2,3-dicarboxylat; Verbindung 3a aus Gelhaus *et al.*, 2004); E-64 (N-(*trans*-Epoxysuccinyl)-L-leucin-4-guanidino-butylamid); E-64d ((2S,3S)-*trans*-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutan-ethylester); EPNP (1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)-propan); Leupeptin (Leupeptin Hemisulfat); Pepstatin A; 1,10-Phenanthrolin (*o*-Phenanthrolin Monohydrat); Phosphoramidon (Phosphoramidon Dinatriumsalz); PMSF (Phenylmethansulfonyl-Fluorid); RV112D (Verbindung 34b aus Schulz *et al.*, 2007); TLCK (N- α -Tosyl-L-lysin-chloromethyl-ke-ton-hydrochlorid); TPCK (N-*p*-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethyl-ke-ton).

Tabelle 2.5A. Verwendete Protease-Inhibitoren (Gelhaus *et al.*, 2004; Rawlings, 2008; Schulz *et al.*, 2007).

Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren					
	TLCK	TPCK	PMSF	Antipain	Leupeptin
Molekulare Masse [g/mol]	369,31	351,85	174,19	677,62	475,59
Summenformel (in benutzter Form)	$C_{14}H_{21}ClN_2O_3S \cdot HCl$	$C_{17}H_{18}ClNO_3S$	$C_7H_7FO_2S$	$C_{27}H_{44}N_{10}O_6 \cdot 2 HCl$	$C_{20}H_{38}N_6O_4 \cdot 1/2H_2SO_4$
Lösungsmittel	Methanol	Methanol	Methanol	Methanol	Methanol
Besonderheiten der Inhibition	Trypsin-ähnliche Serinproteasen	Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen	breites Spektrum an Serinproteasen, Papaine	Serinproteasen, Cysteinproteasen	Trypsin-/Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen, Cysteinproteasen
Art der Hemmung	anfangs reversibel, dann irreversibel	anfangs reversibel, dann irreversibel	Irreversibel (SP), reversibel (CP)	reversibel	reversibel
Cysteinprotease-Inhibitoren					
	E-64	E-64d	bADA	RV112D	
Molekulare Masse [g/mol]	357,41	342,43	650,28	621,31	
Summenformel (in benutzter Form)	$C_{15}H_{27}N_5O_5$	$C_{17}H_{30}N_2O_5$	$C_{34}H_{42}N_4O_7S$	$C_{34}H_{43}N_3O_8$	
Lösungsmittel	Methanol	Methanol	Methanol	Methanol	
Besonderheiten der Inhibition	nicht Membran permeabel	Membran permeabel	hemmt Falcipaine	hemmt Falcipaine	
Art der Hemmung	irreversibel	irreversibel	irreversibel	irreversibel	
Metalloprotease-Inhibitoren			Aspartatprotease-Inhibitoren		
	1,10-Phenanthrolin	Phosphoramidon	EPNP	Pepstatin A	
Molekulare Masse [g/mol]	198,22	587,47	195,17	685,89	
Summenformel (in benutzter Form)	$C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$	$C_{23}H_{32}N_3Na_2O_{10}P$	$C_9H_9NO_4$	$C_{34}H_{63}N_5O_9$	
Lösungsmittel	Methanol	Methanol	Methanol	9:1 Vol. Methanol: Essigsäure	
Besonderheiten der Inhibition	breites Spektrum an Metalloproteasen	starker Inhibitor von Metalloendoproteasen und Thermolysin	inhibiert unter anderem Pepsin	inhibiert Pepsin	
Art der Hemmung	reversibel	reversibel	irreversibel	reversibel	

Die Inhibitoren bADA und RV112D wurden von Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister zur Verfügung gestellt, EPNP von der Firma Acros Organics, Geel und die übrigen Inhibitoren wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen. CP, Cysteinproteasen, SP, Serinproteasen.

Tabelle 2.5B. Verwendete Aktin- und Tubulin-Inhibitoren.

	Cytochalasin B	Colchicin
Molekulare Masse [g/mol]	479.61	399.44
Summenformel (in benutzter Form)	C ₂₉ H ₃₇ NO ₅	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆
Lösungsmittel	Ethanol	Methanol
Besonderheiten der Inhibition	zellpermeabel, inhibiert die Aktin-Polymerisation	Inhibiert die Tubulin-Polymerisation

Die Inhibitoren wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen.

2.1.11 Antikörper

Tabelle 2.6. Verwendete Immunsereen und Antikörper in indirekten Immunfluoreszenzstudien und Western-Blot-Analysen.

Antikörper	Immuni- siertes Tier	Verd. IFA	Verd. WB	Herkunft	Referenz
Anti- <i>Pf</i> Ccp1/1rp1 polyklonal	Maus	1:100	1:200	AG Pradel	(Scholz <i>et al.</i> , 2008)
Anti- <i>Pf</i> Ccp2/2rp3 polyklonal	Maus	1:100	1:100	AG Pradel	(Scholz <i>et al.</i> , 2008)
Anti- <i>Pf</i> Ccp4/4rp1 polyklonal	Maus	1:50	-	AG Pradel	(Scholz <i>et al.</i> , 2008)
Anti- <i>Pfs</i> 230, Region c, polyklonal	Maus	1:200	-	K. Williamson, Chicago/ AG Pradel	(Williamson <i>et al.</i> , 1995; Bustamante <i>et al.</i> , 2000)
Anti- <i>Pfs</i> 48/45 polyklonal	Maus	1:50	-	ATCC, Manassas, Virginia, USA	(Rener <i>et al.</i> , 1983)
Anti- <i>Pfs</i> 25 polyklonal	Kaninchen	1:500	-	ATCC, Manassas, Virginia, USA	(Kaslow <i>et al.</i> , 1988; Kaslow & Shiloach, 1994)
Anti- <i>Pfs</i> 16 polyklonal	Ratte	1:100	-	P. Alano, Rom	(Baker <i>et al.</i> , 1994; Bruce <i>et al.</i> , 1994)
Anti- <i>Pf</i> MSP-1 polyklonal	Kaninchen	1:500	-	ATCC, Manassas, Virginia, USA	-
Anti- <i>Pfact</i> 2 polyklonal	Maus	1:50	-	AG Pradel	(Pradel <i>et al.</i> , in Revision)
anti- α -Tubulin monoklonal	Maus	1:10 ³	-	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	(Piperno & Fuller, 1985)
<i>Pf</i> alpha-tubulin II polyklonal	Kaninchen	1:50	-	ATCC, Manassas, Virginia, USA	(Rawlings <i>et al.</i> , 1992)
Anti- <i>Pf</i> Sub3 polyklonal	Maus	1:10	1:10	AG Pradel	-
Anti- <i>Pf</i> Sub3 Peptid1 und-2 polyklonal	Maus	1:10	1:25	Biogenes, Berlin	-

Antikörper	Immuni- siertes Tier	Verd. IFA	Verd. WB	Herkunft	Referenz
Anti-MBP polyklonal	Maus	-	1:25	AG Pradel	-
Anti- <i>Pf39</i> polyklonal	Maus	-	1:100	AG Pradel	(Templeton <i>et al.</i> , 1997)
Ziegen Serum	Ziege	1:100	-	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	(Dobbelaere <i>et al.</i> , 2008)
Anti-Maus IgG Alexa-488	Ziege	1:10 ³	-	Molecular Probes	-
Anti-Maus IgG Alexa-594	Ziege	1:10 ³	-	Molecular Probes	-
Anti-Kaninchen IgG Alexa-488	Ziege	1:10 ³	-	Molecular Probes	-
Anti-Kaninchen IgG Alexa-594	Ziege	1:10 ³	-	Molecular Probes	-
Anti-Ratte IgG Alexa-594	Ziege	1:10 ³	-	Molecular Probes	-
Streptavidin- Cy3	-	1:500	-	Dianova	-
Anti-Maus IgG alk. Phosphatase	Ziege	-	1: 6x10 ³	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	-

Alk., alkalische; IFA, Indirekte Immunfluoreszenzanalyse; MBP, Maltose-Binde-Protein; Verd., Verdünnung; WB, Western-Blot-Analyse.

2.1.12 Genidentifizierungsnummern

Tabelle 2.7. Für die Arbeit relevante Gene bzw. Proteine und ihre Genidentifizierungsnummern gemäß der *P. falciparum*-Datenbank www.plasmodb.org (Aurrecochea *et al.*, 2009). Unter den angegebenen Identifizierungsnummern können der Datenbank die entsprechenden Basen- und Aminosäuresequenzen der für diese Arbeit relevanten Gene entnommen werden.

Gen	Genidentifizierungsnummer
Calpain	MAL13P1.310
DPAP2	PFL2290w
GPI8	PF11_0298
Metacaspase 2	PF14_0363
Plasmepsin 6	PFC0495w
<i>Pf</i> Sub3	PFE0355c
<i>Pfact</i> 1	PFL2215w
<i>Pfact</i> 2	PF14_0124
<i>Pf</i> alpha-Tubulin-II	PFD1050w
<i>Pf</i> CCp1	PF14_0723
<i>Pf</i> CCp2	PF14_0532
<i>Pf</i> CCp3	PF14_0067
<i>Pf</i> CCp4	PF10185w
<i>Pf</i> CCp5	PFA0445w
<i>Pf</i> FNPA	PF14_0491
<i>Pf</i> Peg3	PFL0795c
<i>Pf</i> Peg4	PF10_0164
<i>Pfs</i> 16	PF11_0318
<i>Pfs</i> 25	PF10_0303
<i>Pfs</i> 28	PF10_0302
<i>Pfs</i> 39	PF11_0098
<i>Pfs</i> 48/45	PF13_0247
<i>Pfs</i> 230	PFB0405w

2.1.13 Angewandte Computerprogramme

- Adobe Acrobat Reader 8
- Adobe Photoshop CS 8.0.1
- BioEdit *sequence alignment editor* 7.0.9.0 (Hall, 1999)
- Clustal W2 (Thompson *et al.*, 1994; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)
- GraphPad Prism 4.00

- Invitrogen Vector NTI 10.3.0
- NCBI BLAST (McGinnis & Madden, 2004; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- MEROPS-Proteasen-Datenbank (Rawlings *et al.*, 2008; <http://merops.sanger.ac.uk>)
- Microsoft Office 97-2003 und 2007(Excel, Word, Power Point)
- Microsoft Windows Media Player
- *P. falciparum*-Datenbank (Aurrecochea *et al.*, 2009; <http://www.plasmodb.org>)
- *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART-Blast; Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2009; <http://smart.embl-heidelberg.de>)
- Thomson EndNote X1
- Zeiss AxioVision Rel. 4.6.3
- Zeiss LSM *Image Browser* Version 3,5,0,359

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Desinfizieren und Sterilisieren

Die nachfolgend aufgeführten mikrobiologischen Arbeiten und insbesondere die Arbeit mit *Plasmodium falciparum* wurden unter strengen sterilen Arbeitsbedingungen ausgeführt. Die Zellkultur mit *P. falciparum* wurde dafür unter der Sterilbank HERASafe durchgeführt. Parasitenabfälle wurden mit einer 13 %igen Lösung von Natriumhypochlorit in ddH₂O abgetötet. Grundlage des sterilen Arbeitens ist das Entfernen und Inaktivieren von unerwünschten Mikroorganismen. Je nach Art des Sterilisationsgutes gab es dazu verschiedene Verfahren:

Autoklavieren

Nichtflüchtige, hitzestabile Medien, Lösungen und Materialien wurden im Autoklaven für 20 Minuten bei 1,1 bar und ca. 120 °C sterilisiert.

Desinfizieren

Gebrauchsgegenstände wurden zur Desinfektion mit einer 70 %igen Ethanol/ddH₂O-Mischung sterilisiert. Spatel oder Plastikspitzen, die in Kontakt mit *E. coli* Zellen gekommen waren, wurden zusätzlich am Bunsenbrenner abgeflammt.

Sterilfiltrieren

Substanzen, die nicht hitzestabil waren, wurden mittels Filtration durch Steritop™-Filter oder einfache Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilisiert.

2.2.1.2 Die Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Bakterienkulturen wurden in LB-Medium bei 37 °C und 180-220 Umdrehungen pro Minute vermehrt. Die mit den Plasmiden pDT_Tg23 und pIH902 transformierten Bakterienkulturen wurden unter Zusatz von 100 µg/ml Ampizillin (LB_{amp}) kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien auf 100 µg/ml Ampizillin enthaltenden Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kopfüber im Brutschrank inkubiert. Bakterienzellen wurden für Plasmid-Isolationen über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert, dagegen für Proteinexpressionstudien für ca. drei Stunden bei 30 °C. Für die langfristige Konservierung von Bakterienkulturen wurden Aliquots mit Glycerin im Verhältnis von eins zu eins gemischt und in Kryogefäßen bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3 Die Herstellung kompetenter Bakterien

Um Bakterien mit DNA transformieren zu können (siehe 2.2.1.4), wurden chemisch kompetente Bakterien verwendet. Eine Möglichkeit der Herstellung chemisch kompetenter Bakterien ist die Behandlung von Bakterienzellen mit Kalziumchlorid. Dafür wurden 3 ml LB-Medium mit Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180-220 Umdrehungen pro Minute schüttelnd inkubiert. Von dieser Bakterienstammlösung wurde am nächsten Tag 1 ml mit 49 ml LB-Medium verdünnt und für 3 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf zwei 50-ml-Einmal-Reaktionsgefäße aufgeteilt und für zehn Minuten mit 1300 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Bakterienzellen wurden ab diesem Zeitpunkt zwischen den Arbeitsschritten nur noch auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde von den zentrifugierten Proben abgenommen und die Einmalgefäße invertiert aufgestellt, um die Flüssigkeit von den pelletierten Zellen ablaufen zu lassen. Pro Bakterienpellet wurden je 12 ml einer eiskalten 100 mM Kalziumchloridlösung zugegeben und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien zehn Minuten mit 1300 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde erneut abgenommen und die Gefäße invertiert aufgestellt. Die Bakterienpellets wurden in je 1 ml Kalziumchlorid vorsichtig resuspendiert, danach vereinigt und 45 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abschließend mit 400 µl eiskaltem, 86 %igem Glycerin vermischt, und die Bakterien in 200-µl-Aliquots in Kryogefäßen bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.4 Die Transformation kompetenter Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden chemisch kompetente *E.-coli*-Bakterien für den Plasmidtransfer in Bakterienzellen verwendet. Die kommerziell erhältlichen Zellen BL21-CondonPlus-(DE3)-RIL-Zellen wurden für die Proteinexpression verwendet und entweder kommerziell erworbene oder selbst hergestellte kompetente *OneShot*-Top10-Zellen für Plasmidpräparationen benutzt (siehe Kapitel 2.2.1.3 und 2.2.2.8). Für die Plasmid-Transformation wurden die kompetenten Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und 20 µl davon mit 100 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µl Ligationsansatz gemischt. Die Zellen wurden zunächst auf Eis für 30 Minuten und anschließend für 30 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Aufgrund dieses Hitzeschocks nehmen die kompetenten Bakterien die Plasmid-DNA auf. Die Bakterienzellen wurden für zwei Minuten auf Eis inkubiert und danach in 200 µl SOC-Medium resuspendiert. Die Transformationsansätze wurden bei 37 °C und 180-220 Umdrehungen pro Minute schüttelnd für eine Stunde inkubiert, anschließend auf LB_{amp}-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht kopfüber bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.5 Die Kultivierung und Konservierung von *P. falciparum*

Kultivierung

Die *in-vitro*-Kultivierung intraerythrozytärer Stadien von *P. falciparum* (Trager & Jensen, 1976; Ifediba & Vanderberg, 1981) erfolgte in 25 cm²- bzw. 75 cm²-Zellkulturflaschen in Zellkulturmedium mit einem Hämatokritwert von 5 %. Die Zellkulturflaschen wurden bei 37 °C inkubiert, und mindestens täglich mit einem Gasgemisch aus 5 % O₂ /5 % CO₂ /90 % N₂ begast. Das Medium wurde täglich durch Absaugen des Flüssigkeitsüberstandes über den sedimentierten Erythrozyten entfernt und durch auf 37 °C vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt. Die Erythrozyten wurden vorsichtig in dem Zellkulturmedium resuspendiert. Jeden zweiten Tag wurden anschließend 200 µl Zellsuspension der Zellkulturflasche entnommen und die Zellen bei 3400 g für eine Minute pelletiert. Die Parasitämiebestimmung erfolgte mittels dünner Blutausrichungen und Giemsa-Färbung (siehe 2.2.1.6). Die Zellkulturen wurden generell bei den Arbeiten außerhalb des 37 °C Inkubators auf 37 °C Wärmeplatten abgestellt. Kontinuierliche asexuelle Zellkulturen wurden bei Erreichen einer Parasitämie von 1 % im Verhältnis eins zu 20 von parasitierten Erythrozyten zu Zellkulturmedium (Hämatokritwert 5 %) verdünnt. Für die Kultivierung der intraerythrozytären Sexualstadien wurde 1 ml der asexuellen Zellkultur in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt, und mit 24 ml Zellkulturmedium (Hämatokritwert 5 %) verdünnt. Die Entwicklung der Sexualstadien wurde mittels dünner Blutausrichungen und Giemsa-Färbung überprüft (siehe 2.2.1.6). Nach 14-20 Tagen Kultivierung waren überwiegend Stadium-V-Gametozyten in den Kulturen

Material und Methoden

vorhanden. Um den Reifezustand der Gametozyten zu testen, wurden Exflagellationstests (siehe 2.2.1.9) durchgeführt. Für die Gewinnung von Gameten und Zygoten wurden Aliquots reifer Gametozytenkulturen in 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäße überführt, mit 3400 x g pelletiert, und die Zellen in Aktivierungslösung 2 resuspendiert. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten bzw. über-Nacht-Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die Gameten bzw. Zygoten für weitergehende Analysen verwendet (Aufreinigung von Gameten und Zygoten siehe 2.2.1.12). Für die Gewinnung von *in-vivo*-generierten Gameten und Zygoten, wurden Stechmückeninfektionen durchgeführt. Dafür wurden 250 µl nicht infizierter Erythrozyten in 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäße überführt und mit 3400 x g für eine Minute abzentrifugiert. Bei dem Vorgang wurde darauf geachtet, dass alle Materialien und Lösungen auf 37 °C vorgewärmt waren, um eine vorzeitige Aktivierung der Gametozyten zu verhindern. Die nicht infizierten Erythrozyten wurden mit Stadium-V-Gametozytenkulturen auf ein Volumen von 1,5 ml aufgefüllt und vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden ebenfalls pelletiert (siehe oben) und im Verhältnis eins zu eins mit humanem Serum vermischt. Das Zellgemisch wurde in eine Membranfütterungsvorrichtung überführt und *Anopheles-stephensi*-Stechmücken für ca. fünf Minuten zur Aufnahme einer Blutmahlzeit überlassen (Bishop & Gilchrist, 1946; Ponnudurai *et al.*, 1989). Zur Analyse der Mückenstadien von *P. falciparum* wurde der Mitteldarminhalt der mit Chloroform anästhesierten Stechmücken untersucht. Für die Analyse der *in-vivo*-generierten, lebenden Gameten wurde der Mitteldarminhalt der Stechmücken ca. zehn Minuten nach Beginn der Fütterung auf einen Objektträger übertragen und lichtmikroskopisch untersucht. Die Stechmückeninfektionen mit anschließender Analyse des Mitteldarminhaltes geschah während eines Forschungsaufenthaltes im Labor von und in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. K.C. Williamson, Loyola Universität, Chicago. Zusätzlich wurde in Zusammenarbeit mit Herrn cand. biol. R. Frank (Imperial College, London) der Mitteldarminhalt von Stechmücken ca. sechs Stunden nach deren Fütterung auf einen Objektträger dünn ausgestrichen und für anschließende indirekte Immunfluoreszenzstudien für zehn Minuten bei -80 °C Methanol fixiert.

Konservierung

Für die langfristige Konservierung von *P. falciparum* wurden asexuelle Zellkulturen bis zu einer Parasitämie von fünf bis zehn Prozent kultiviert. Befanden sich ≥ 50 Prozent der Parasiten als Ringstadien vor (siehe 2.2.1.6), wurde die Kultur in ein 15-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt und für fünf Minuten mit 1300 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend vorsichtig in 1,8 ml *Glycerolyte* 57 aufgenommen und je die Hälfte in ein 1,5-ml-Kryogefäß transferiert. Die Zellen wurden anschließend für fünf Minuten bei RT

inkubiert und dann in einer Styropor-Box bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie dann in übliche Aufbewahrungsbehälter bei -80 °C überführt.

Um die eingefrorenen Parasiten wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryogefäße auf Eis aufgetaut und die Zellen in ein 15-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt. Tropfenweise wurden anschließend 200 µl einer 12 %igen NaCl-Lösung zugegeben. Nach zwei Minuten Inkubation bei RT wurden 10 ml einer 1,6 %igen NaCl-Lösung tropfenweise zugegeben und die Zellen fünf Minuten bei 1300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend vorsichtig in 10 ml 0,2 % Dextrose/0,9 % NaCl resuspendiert und erneut für fünf Minuten bei 1300 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden daraufhin direkt in eine 25 cm²-Zellkulturflasche mit 5 ml Zellkulturmedium (Hämatokritwert 5 %) überführt und kultiviert (siehe oben).

2.2.1.6 Dünner Blutausstrich und Parasitämiebestimmung

Asexuelle Parasitenkulturen und Gametozytenkulturen wurden regelmäßig in Hinblick auf ihre Parasitämie und das Entwicklungsstadium der enthaltenden Parasiten untersucht. Dafür wurden 200 µl der zu untersuchenden Kultur in ein 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt und mit 3400 x g für eine Minute zentrifugiert. Von den pelletierten parasitierten Erythrozyten wurden 0,2 µl auf einen Objektträger transferiert und mittels eines anderen Objektträgers dünn auf der Glasoberfläche verteilt. Die Zellen sollten dabei in einer einzigen Zellschicht verteilt vorliegen. Nach Trocknung der Zellen wurden sie mit 100 % Methanol bei RT fixiert und erneut getrocknet. Die Objektträger wurden anschließend für 15 Minuten in frisch zubereiteter Giemsalösung bei RT inkubiert. Überschüssige Giemsalösung wurde durch Spülen mit ddH₂O nach der Inkubation entfernt und die Objektträger getrocknet. Die Parasitenstadien wurden danach bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv untersucht und die Parasitämie in mindestens 5 Gesichtsfeldern bestimmt. Die Parasiten werden durch das Anfärben mit Giemsalösung in lila bis blauer Färbung hervorgehoben, die Erythrozyten erscheinen hellrosa. Die Aufnahmen der Parasitenstadien wurden mit einer Digitalkamera angefertigt (Abbildung 1.2 und 3.2).

2.2.1.7 Die Herstellung von Gen-*knockout*-Parasiten

Für die Herstellung von Gen-*knockout*-Parasiten wurde die Strategie des Gen-*knockouts* (KO) über homologe *single-crossover*-Rekombination gewählt (Wu *et al.*, 1996; schematische Darstellung des Prinzips in Abbildung 2.3). Mittels PCR wurde ein Genabschnitt nahe dem 5'-Terminus des Gens von Interesse amplifiziert. Die Oligonukleotidpaare für die Vervielfältigung dieses Genabschnittes wurden den

Gensequenzen gemäß der *P.-falciparum*-Genbank (<http://www.plasmodb.org>; Aurrecochea *et al.*, 2009) zu Beginn dieser Arbeit ausgewählt (Oligonukleotidpaare KO1 und KO2 aus Abbildung 2.3; siehe Tabelle 2.4). Der ausgewählte Genabschnitt der einzelnen Proteasen wurde anschließend in den Vektor pDT_Tg23 (Abbildung 2.1A; die vollständige Basensequenz des Vektors ist dem Anhang auf CD beigefügt) angrenzend an den 3'-Terminus der *hrp2*-Sequenz zwischen die Restriktionsschnittstellen SacII und NotI kloniert. Für die Herstellung der Konstrukte wurden die DNA-Polymerasen *Pfx* (für die Gene von *Calpain*, *DPAP2*, *GPI8*, *Metacaspase 2* und *Plasmepsin 6*) und *Green Go Tag* (für das Gen von *PfSub3*) verwendet. An den 3'-Terminus des amplifizierten Genabschnittes wurde dabei ein artifizielles Stopp-Codon (TAA) angehängt (vergleiche mit Tabelle 2.4). Das resultierende *knockout*-Konstrukt wurde mittels Maxiprep-Plasmidisolierung amplifiziert (siehe 2.2.2.8) und nach dem letzten Waschschrift mit 70 %igem Ethanol steril in 600 µl Cytomix-Puffer (Wu *et al.*, 1995) resuspendiert. Asexuelle Parasitenkulturen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen bis zu einer Parasitämie von ≥ 5 % kultiviert. Es wurde darauf geachtet, die Transfektion durchzuführen, wenn die Parasiten in der Kultur überwiegend als Ringstadien und Trophozoiten vorlagen. Die asexuelle Parasitenkultur wurde in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1300 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Pro Transformationsansatz wurden 200 µl der DNA in Cytomix-Puffer mit 200 µl der pelletierten Parasiten vermischt und in Elektroporationsküvetten transferiert. Die DNA wurde in die Parasiten für die Dauer von 10 Sekunden bei einer Spannung von 0,31 kV und einer Leistung von 975 µF elektroporiert (Wu *et al.*, 1995). Direkt danach wurden die Zellen mit 500 µl Zellkulturmedium in den Küvetten vermischt, um ein Überhitzen der Zellen zu vermeiden. Der Elektroporationsansatz wurde anschließend in 25 cm²-Zellkulturflaschen, die 8 ml Zellkulturmedium (Hämatokritwert von 5 %) enthielten, überführt. Die transfizierten Parasiten wurden wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben kultiviert. Ein Tag nach der Elektroporation wurden 200 µl nicht parasitierter Erythrozyten der Kultur zugegeben. Zusätzlich wurde am Tag nach Elektroporation und am zweiten Tag nach Elektroporation das Medium aus den transfizierten Kulturen zweimal pro Tag gewechselt. Das Zellkulturmedium aus den transfizierten Kulturen wurde exakt 48 Stunden nach Elektroporation durch 100 ng/ml Pyrimethamin enthaltendes Selektionsmedium ausgetauscht. Am vierten Tag nach Elektroporation wurde das Selektionsmedium wiederum durch 15 ng/ml Pyrimethamin enthaltendes Selektionsmedium ausgetauscht. Sobald die ersten asexuellen Parasitenstadien mittels dünnem Blutausschrieb und Giemsa-Färbung (siehe 2.2.1.6) nachweisbar waren, wurden Aliquots bei -80 °C konserviert und genomische DNA mittels Anwendung des *QIAamp Blood Mini Kits* isoliert. Nach Verifizierung des Genlocus mittels PCR (siehe 2.2.2.2) wurde in einigen Fällen die transfizierte Kultur für vier Wochen in Zellkulturmedium ohne Pyrimethaminselektion kultiviert (siehe 3.1.2.2). Anschließend wurden die Parasiten langfristig mit 500 ng/ml Pyrimethamin-

enthaltendem Selektionsmedium kultiviert. Nach Elektroporation der Plasmid-DNA in asexuelle Parasitenstadien von *P. falciparum* kann über die homologen Genregionen eine *single-crossover*-Rekombination auftreten. Der wildtypische Genlocus wird dabei durch die Integration des *knockout*-Vektors unterbrochen und das frühe Stopp-Codon im Gen unterbindet zusätzlich eine eventuelle Transkription. Die resultierenden *Gen-knockout*-Parasiten sind pseudo-diploid bezüglich dieses Genlocus und aufgrund des ebenfalls integrierten Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase-Gens aus *Toxoplasma gondii* (*TgDHFR-TS*) Pyrimethamin-resistent (Wu *et al.*, 1996). Ausgewählte Oligonukleotidpaare (siehe Abbildung 2.3 und Tabelle 2.4) wurden in Verbindung mit isolierter DNA aus den elektroporierten Parasiten in PCR-Reaktionen eingesetzt, um Aufschluss über den Genlocus zu erhalten (siehe 2.2.2.2).

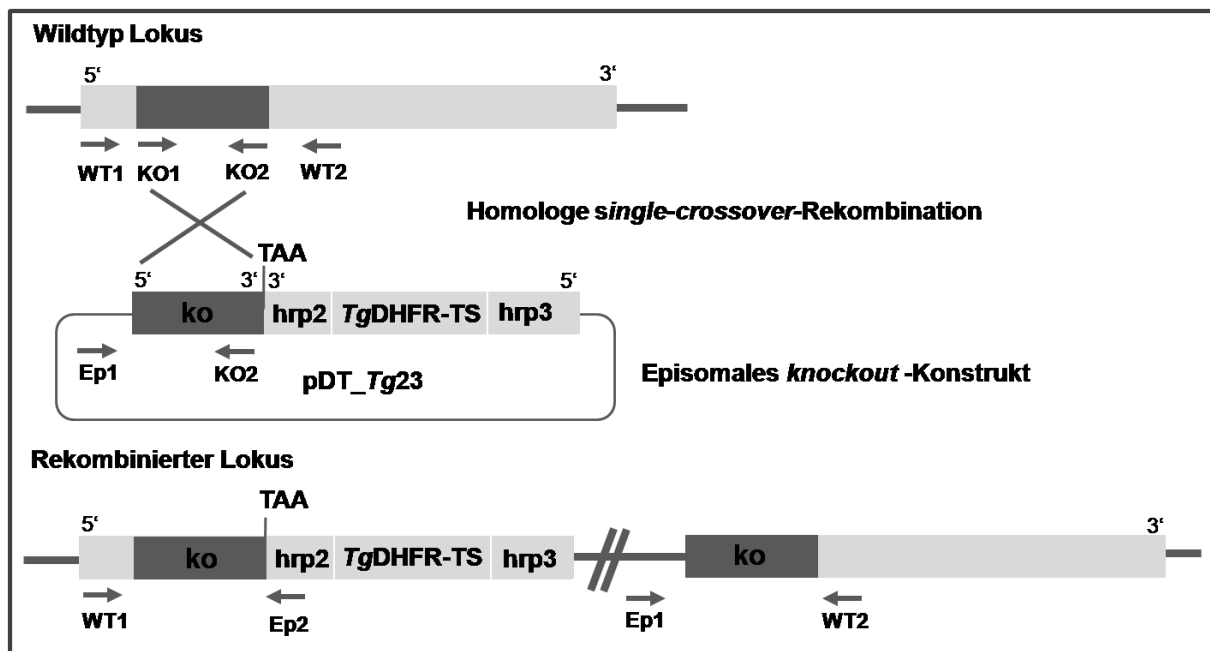


Abbildung 2.3. Prinzip der Herstellung von KO-Parasiten durch homologe *single-crossover*-Rekombination. In den Vektor pDT_Tg23 wird ein amplifiziertes Stück des Gens von Interesse kloniert und dieses KO-Konstrukt in asexuelle Parasitenkulturen transfiziert durch Elektroporation. Der wildtypische Genlocus wird unterbrochen, wenn der Vektor durch homologe *single-crossover*-Rekombination in den Locus integriert. Die resultierenden KO-Parasiten sind pyrimethaminresistent und deren DNA lässt sich bezüglich des Genlocus mittels PCR und darin eingesetzten spezifischen Oligonukleotidpaaren untersuchen. Die Oligonukleotidpaare WT1/WT2 detektieren den wildtypischen Locus, Ep1/KO2 das knockout-Konstrukt, WT1/Ep2 oder Ep1/WT2 den rekombinierten Locus. Oligonukleotidpaare KO1/KO2 wurden zur Herstellung des KO-Konstruktes verwendet. Hrp2, Histonreiches Protein 2; hrp3, Histonreiches Protein 3, *TgDHFR-TS*, Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase aus *Toxoplasma gondii*.

Das Oligonukleotidpaar WT1 und WT2 dient zur Detektion des wildtypischen Genlocus, Ep1 und KO2 zur Detektion des episomalen *knockout*-Konstruktes, WT1 und Ep2 zur Detektion des rekombinierten Genlocus am 5'-Terminus und Ep1 und WT2 zur Detektion des rekombinierten Genlocus am 3'-Terminus. Das Oligonukleotidpaar KO1 und KO2 wurde zur Genamplifikation bei der Herstellung des KO-Konstruktes eingesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die amplifizierte Region vor der katalytischen Domäne der ausgewählten Proteasen liegt (für die schematische Darstellung des *PfSub3* Proteins mit katalytischer Domäne siehe Abbildung 3.9).

2.2.1.8 Die Klonale Selektion von KO-Parasiten

Mittels PCR-Analyse wurde der Zustand des Genlocus des auszuschaltenden Gens in den transfizierten asexuellen Parasitenkulturen überprüft (siehe 2.2.1.7 und 3.1.2.2). Bei Feststellung einer Bande für den rekombinierten Genlocus wurden einzelne Parasitenzellen aus der polyklonalen Kultur durch vereinzelt ausgesähen ausgewählt und kultiviert. Dazu wurden die polyklonalen Kulturen in Mikrotiterplatten soweit verdünnt, dass nach Aussaat theoretisch in jeder achten Vertiefung eine einzelne Parasitenzelle kultiviert wurde. Die Bestimmung der Anzahl der infizierten Erythrozyten erfolgte durch die Ermittlung der Parasitämie der polyklonalen Kulturen durch dünne Blutaussstriche und Giemsa-Färbung unter Berücksichtigung der Anzahl der vorhandenen Erythrozyten pro Milliliter in dieser Kultur. Dafür wurde ein 10- μ l-Aliquot der polyklonalen Kultur eins zu 200 in 1 x PBS verdünnt und die Anzahl der Erythrozyten pro ml unter Benutzung der Neubauer-Zählkammer (siehe 2.2.1.13) bestimmt. Die einzelnen Parasitenklone wurden in je 200 μ l 500 ng/ml Pyrimethaminselektionsmedium kultiviert, welches jeden dritten Tag durch 180 μ l Medium ausgetauscht wurde. Zur Erhaltung der benötigten Gaszusammensetzung wurden die Mikrotiterplatten in einer speziellen abgeschlossenen Plexigaskammer im 37 °C Inkubator aufbewahrt, in die das Gas jeden Tag für drei Minuten durch ein Ventil geleitet wurde. Nach drei Wochen Kultivierung mit Selektionsmedium wurden die Mikrotiterplatten auf Parasiten überprüft mit Hilfe des *Malstat-Screenings* (Goodyer & Taraschi, 1997). Hierfür wurden pro Vertiefung jeweils 20 μ l Zellsuspension in eine neue Mikrotiterplatte überführt und mit 100 μ l Malstat-Reagenz sowie 20 μ l NBT/Diaphorase-Mischung versetzt. Der Ansatz wurde 30 bis 50 Minuten bei RT geschüttelt, bis ein Farbumschlag von rot zu blau in den parasitenhaltigen Vertiefungen erkennbar war. Die photometrische Auswertung der 96 Vertiefungen pro Mikrotiterplatte erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 640 nm. Einzelne Klone wurden aufgrund eines Farbumschlags und einer OD > 0,2 ausgewählt, und mittels dünner Blutaussstriche und Giemsa-Färbung das Enthalten von Parasiten in den ausgewählten Vertiefungen verifiziert. Die Zellen in den parasitenhaltigen Vertiefungen wurden

resuspendiert und in 25 cm²-Flaschen mit 5 ml Selektionsmedium und einem Hämatokrit von 5 % zur Kultivierung transferiert. Die genomische DNA der einzelnen Klone wurde bei einer Parasitämie von 1-2 % der Kulturen mittels Anwendung des *QIAamp Blood Mini Kits* isoliert und anschließend durch diagnostische PCR analysiert (siehe 2.2.1.8).

2.2.1.9 Der Exflagellationstest

Um den Reifestand der Gametozytenkulturen zu testen, wurde in *P.-falciparum*-Zellkulturen, die Stadium-IV/V-Gametozyten aufwiesen, die Aktivierungsfähigkeit der Stadium-V-Gametozyten mittels Exflagellationstest überprüft. Dafür wurden 300 µl der vorsichtig resuspendierten Kultur mit 3400 x g für eine Minute zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Aktivierungslösung 1 für 15 Minuten bei RT inkubiert und ca. 20 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen. Die Zellen wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt und bei 400-facher Vergrößerung das Auftreten von sich bewegenden, aktivierten Mikrogametozyten in Exflagellationszentren (Abbildung 2.4) untersucht. Die aktivierten Mikrogametozyten binden dabei an umliegende Erythrozyten, was als rosettenartige Exflagellationszentrenbildung beschrieben wird (Pradel, 2007). Das Vorkommen der Exflagellationszentren und deren Anzahl pro Gesichtsfeld wurden beim Test auf Exflagellation bestimmt. Dem Anhang ist eine Videoaufnahme beigefügt, die einen exflagellierenden Mikrogametozyten zeigt, der an einen Makrogameten adhärert und umliegende Erythrozyten an sich heran schlägt ('exflagellierender Mikrogametozyt', Daten auf CD).



Abbildung 2.4. Ein aktivierter Mikrogametozyt bindet an umliegende Erythrozyten und bildet ein Exflagellationszentrum. Reife Gametozytenkulturen wurden aktiviert, und nach 15-minütiger-Inkubation bei RT lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung untersucht. Das Vorkommen von Exflagellationszentren kennzeichnet eine reife Gametozytenkultur. Erythrozyten können aufgrund des osmotischen Drucks der Aktivierungslösung eine stechapfelähnliche Form annehmen. Pfeil, aktivierter Mikrogametozyt; Größenangabe, 5 µm.

2.2.1.10 Der Exflagellationsinhibitionsassay

Der Exflagellationsinhibitionsassay (EIA) untersucht den Einfluss bestimmter Substanzen auf die Mikrogametozytenexflagellation (Scholz *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde

der Einfluss von verschiedenen Protease- und Zytoskelett-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation untersucht. Für die Analyse wurden reife Gametozytenkulturen ausgewählt, die beim Exflagellationstest (siehe 2.2.1.9) zwei bis drei Exflagellationszentren pro Gesichtsfeld aufwiesen. Von der Gametozytenkultur wurden ca. 300 µl der Zellsuspension abgenommen und mit 3400 x g für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Aktivierungslösung 2 für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Zugabe der Protease-Inhibitoren erfolgte entweder 15 Minuten vor der Aktivierung unter normalen Zellkulturbedingungen (37 °C) oder die Protease-Inhibitoren wurden mit der Aktivierungslösung 2 zugegeben. Die Zytoskelett-Inhibitoren wurden ebenfalls zeitgleich mit der Aktivierungslösung 2 verabreicht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 20 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Auszählung der Exflagellationszentren pro 30 Gesichtsfelder erfolgte im Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Jeder Versuchsansatz wurde in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Inhibitor-unbehandelte Kontrollen, die mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel der Inhibitoren unter gleichen Bedingungen inkubiert worden waren ('0-µM-Kontrolle'). Für die Auswertung der konzentrationsabhängigen Dosis-Effekt-Kurven (siehe Abbildung 3.1A, 3.1B und 3.19A) wurden die Ergebnisse der drei Ansätze gemittelt, und deren Standardabweichung bestimmt.

2.2.1.11 Die LysoTracker-Färbung von *P. falciparum*

Für die Untersuchung lebender, nicht fixierter Parasitenstadien wurden 500 µl einer reifen Gametozytenkultur mit 3400 x g für eine Minute abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Aktivierungslösung 1 aufgenommen, und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit dem Farbstoff LysoTracker™ (*LysoTracker Red DND-99*, Molecular Probes) in einer Konzentration von 4 µM versetzt. Die Ansätze wurden für weitere fünf Minuten inkubiert, auf Objektträger transferiert und mit einem Deckgläschen abgedichtet. Die Analyse der Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Für das *live imaging* der Parasitenstadien erfolgte die Analyse der Zellen am konfokalen Laserrasterfluoreszenzmikroskop. Diese Aufnahmen wurden anschließend in Videodateien (AVI) konvertiert.

2.2.1.12 Die Aufreinigung von Parasitenstadien

Gametozyten

Die Aufreinigung von Gametozyten erfolgte durch Dichtezentrifugation entlang eines Percoll®-Gradientens (Kariuki *et al.*, 1998). Vorbereitend wurden alle Lösungen und Geräte, die in Kontakt mit den aufzureinigenden Parasiten kamen, auf 37 °C vorgewärmt. Aus der Percoll-Stammlösung (1,3 g/ml, entspricht 100 %, Sigma-Adrich) wurden zunächst 5,5 ml einer 90 %igen Arbeitslösung durch Verdünnung mit 10 x RPMI *incomplete* (ICM) hergestellt. Anschließend wurden je 2 ml von 80-, 65-, 50- und 35 %igen Percoll-Lösungen durch Verdünnung der Arbeitslösung mit 10 x ICM hergestellt. Die Percoll-Lösungen wurden, beginnend mit der höchsten Dichte, übereinander in ein 15-ml-Einmal-Reaktionsgefäß geschichtet. Maximal zwei Gametozytenkulturen wurden vereinigt, und mit 1300 x g für fünf Minuten bei 37 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml 1 x ICM resuspendiert und auf den Percollgradienten geschichtet. Die Gametozyten lagerten sich nach Zentrifugation mit 1500 x g für zehn Minuten bei 37 °C in der ersten und zweiten Interphase des Gradientens (von oben abwärts gezählt) an. Diese Interphasen wurden abgenommen, in ein 15-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt und mit Zellkulturmedium auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Sollten die Gametozyten anschließend in Western-Blot-Analysen eingesetzt werden, wurde die absolute Anzahl der Gametozyten in der Zellsuspension mittels Anwendung der Neubauer-Zählkammer (siehe 2.2.1.13) bestimmt. Die Zellsuspension wurde mit 1300 x g für fünf Minuten bei 37 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden entweder direkt verwendet, oder in ein 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

Gameten und Zygoten

Die Aufreinigung von Gameten und Zygoten erfolgte durch Dichtezentrifugation entlang eines Accudenzgradientens. Es wurde zunächst eine reife Gametozytenkultur mit 1300 g für fünf Minuten bei 37 °C abzentrifugiert und die Zellen anschließend in zwei Volumenanteilen des Zellpellets Aktivierungslösung 2 bei RT inkubiert. Die Aufreinigung der Gameten bzw. Zygoten erfolgte nach 30 Minuten bzw. 20 Stunden Inkubationszeit. Es wurde zunächst eine 6- und eine 11 %ige Accudenzlösung in 1 x RPMI *incomplete* (ICM) hergestellt. Anschließend wurde der Accudenz-Gradient, beginnend bei der 6 %igen Lösung, in ein 50-ml-Einmal-Reaktionsgefäß gegeben, auf die die 11 %ige Accudenz-Lösung unterschichtet wurde. Die Gameten und Zygoten in Aktivierungslösung 2 wurden auf den Gradienten aufgetragen und mit 3400 x g für zehn Minuten bei 37 °C zentrifugiert. Es wurden anschließend ca. 15 ml der Interphase abgenommen, in ein 50-ml-Einmal-Reaktionsgefäß transferiert, und mit 1 x ICM auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit je

20 ml 1 x ICM und Zentrifugation mit 1300 g für fünf Minuten bei 37 °C. Ein 5- μ l-Aliquot des Zellpellets wurde unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung untersucht, um den Gameten-, bzw. Zygotenanteil im Gegensatz zum Gametozytenteil zu überprüfen. Die Zellen wurden für die Extraktion von RNA direkt weiter verwendet (siehe 2.2.2.10).

Asexuelle Parasitenstadien

Für die Aufreinigung asexueller Parasitenstadien wurde die Parasitenlinie F12 verwendet, die keine Gametozysten ausbildet (Alano *et al.*, 1995). Die Aufreinigung erfolgte durch Saponin-Lyse der Wirtszellmembran. Die Parasitenkulturen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen bis zu einer Parasitämie von fünf bis zehn Prozent kultiviert. Die Parasitämie wurde mittels dünner Blutaussstriche und Giemsa-Färbung bestimmt (siehe 2.2.1.6) sowie die Erythrozytendichte durch Anwendung der Neubauer-Zählkammer ermittelt (siehe 2.2.1.13). Die Zellen wurden in ein 50-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt, mit 3400 x g für fünf Minuten abzentrifugiert und im fünffachen Zellpellet-Volumen mit 1 x PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut bei 3400 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, im fünffachen Zellpellet-Volumen 1 x PBS aufgenommen und mit 0,015 % Saponin versetzt. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei RT inkubiert, und anschließend mit 1 x PBS auf ein Volumen von 15 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde mit 3400 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Das schwarze Zellpellet wurde in 2 x 500 μ l 1 x PBS aufgenommen, und in ein 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt. Die Zelldichte der aufgereinigten Parasitenstadien wurde erneut durch Anwendung der Neubauer-Zählkammer bestimmt, und mit dem errechneten theoretischen Wert vom Beginn verglichen und eventuell korrigiert. Die Zellen wurden mit 1300 x g für eine Minute abzentrifugiert, der Flüssigkeitsüberstand komplett abgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.13 Die Bestimmung der Zelldichte mittels Neubauer-Zählkammer

Die Neubauer-Zählkammer wurde verwendet, um die Zelldichte von Erythrozyten in Parasitenkulturen zu bestimmen oder um die Anzahl asexueller Parasitenstadien sowie Gametozysten in aufgereinigten Proben zu bestimmen. Für die Ermittlung der Zelldichte parasitierter Erythrozyten wurden 100 μ l der Parasitenkultur abgenommen und eins zu 200 mit 1 x PBS verdünnt. Für die Bestimmung der Zellanzahl in Proben aufgereinigter Parasiten wurden die Proben eins zu 50 mit 1 x PBS verdünnt. Die Neubauer-Zählkammer wurde mit 70 %iger Ethanollösung in ddH₂O gereinigt und ein plangeschliffenes Deckglas aufgelegt. Anschließend wurden 10 μ l der Zellsuspension in eine der Kammern mit dem darunter eingravierten Zählnetz seitlich aufpipettiert. Es wurde die Zellanzahl in vier der grossen Quadrate (à 4 x 4 Kleinstquadrate) lichtmikroskopisch bestimmt. Anschließend wurde die

Zellanzahl mit dem Kammerfaktor multipliziert und die absolute Anzahl der Zellen pro Milliliter ermittelt. Folgende Formel diente der Ermittlung der Zellanzahl: Anzahl der Zellen in 4 Quadranten*Verdünnungsfaktor/4*10⁴= Zellanzahl der Proben/ml.

2.2.1.14 Indirekte Immunfluoreszenzstudien

Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA) dient dazu, um ein Protein von Interesse unter Verwendung von Primärantikörpern und Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse in der Zelle sichtbar zu machen. Dabei werden Sekundärantikörper verwendet, die gegen die F_c-Region der Primärantikörper gerichtet sind. Die F_c-Region von Antikörpern ist spezifisch für die Spezies, in der der Antikörper hergestellt wurde (die immunisierte Spezies). Biotin-gekoppelte Primärantikörper bzw. Moleküle können über Fluorochrom-Streptavidin-Konjugate sichtbar gemacht werden. Für die Proben der in dieser Arbeit durchgeführten indirekten Immunfluoreszenzstudien wurden 300 µl der zu untersuchenden Parasitenkultur abgenommen und ein Tropfen davon dünn in die kreisrunden Aussparungen eines teflonbeschichteten Objektträgers aufgetragen. Alternativ dazu wurden 300 µl einer vorsichtig resuspendierten Parasitenkultur in ein 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt und mit 3400 x g für eine Minute zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in ca. 100 µl Aktivierungslösung 2 resuspendiert und in der Regel für 30-60 Minuten bei RT inkubiert. In einigen wenigen hervorgehobenen Ausnahmen wurden die Proben zwischen 5 Minuten und 12 Stunden in der Aktivierungslösung 2 inkubiert. Die Proben wurden danach in die kreisrunden Aussparungen eines teflonbeschichteten Objektträgers aufgetragen. Die Zellen wurden getrocknet, anschließend bei -80 °C in Methanol fixiert und wiederum getrocknet. Der Objektträger wurde für 30 Minuten in IFA-Inkubationslösung in einer Färbeschale inkubiert. Dies diente zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Antigene im Präparat, sowie zur Perforierung der Zellmembranen, um die Zugänglichkeit der Antikörper zu intrazellulären Proteinen zu erhöhen. Die Zellen wurden anschließend für 30 Minuten in 1 %igem Ziegenerum in IFA-Inkubationslösung für die weitere Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Dafür wurden je 30 µl der Lösung in die Aussparungen des horizontal gelagerten Objektträgers gegeben. Der Objektträger wurde ab diesem Schritt und während den folgenden Inkubationen mit geringen Volumina in einer feuchten Kammer bei 37 °C lichtunzugänglich gelagert. Es folgte die Inkubation der Zellen in der Primärantikörper-Lösung. Dafür wurde das Immuneserum, welches gegen das Protein von Interesse gerichtet ist, in Inkubationslösung in der gewünschten Konzentration verdünnt (siehe Tabelle 2.6). Bei Doppelmarkierungen wurden die Primärantikörper zusammen in der Inkubationslösung verdünnt. Es wurden 25 µl der Antikörperlösung auf die Aussparungen der Objektträger

gegeben und für eine Stunde inkubiert. Die Proben wurden anschließend zweimal für zehn Minuten mit Inkubationslösung in einer Färbeschale gewaschen. Die Färbeschale wurde dabei auf der Wippe leicht bewegt. Es folgte die Inkubation der Zellen mit 25 µl Sekundärantikörperlösung, verdünnt in IFA-Inkubationslösung, pro Aussparung des Objektträgers. Bei Doppelmarkierungen wurden die zwei Sekundärantikörper zusammen in der IFA-Inkubationslösung verdünnt. Dafür standen Alexa-488 (grüne Fluoreszenz)- und Alexa-594 (rote Fluoreszenz)-gekoppelte Sekundärantikörper zur Verfügung, sowie ein Cy3 (rote Fluoreszenz)- Streptavidin-Konjugat. Die Zellen wurden für eine Stunde inkubiert und anschließend zweimal für fünf Minuten in 1 x PBS in der Färbeschale gewaschen. Zur Markierung der Erythrozyten wurden die Zellen anschließend für 30 Sekunden in einer 0,01 %igen *Evans-Blue* (rote Fluoreszenz)-Lösung bei RT inkubiert, falls vorher keine Markierung mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt wurde. Die Proben wurden zweimal für fünf Minuten mit 1 x PBS in der Färbeschale gewaschen. Die Markierung von DNA erfolgte anschließend durch die Inkubation für 30 Sekunden bei RT mit *Hoechst Nuclear Stain* (blaue Fluoreszenz), welches vorher in einem Verhältnis von eins zu 5000 mit 1 x PBS verdünnt worden war. Für diese Arbeit konnten keine Aufnahmen der Doppelfärbungen mit *Hoechst Nuclear Stain* angefertigt werden, da die Ausrüstung des verwendeten konfokalen Laserrasterfluoreszenzmikroskops dafür nicht geeignet war. Die Proben wurden anschließend für fünf Minuten mit 1 x PBS in der Färbeschale gewaschen und überschüssige Flüssigkeit entfernt. Die Zellen wurden mit Einbettungsmedium überschichtet, anschließend mit einem Deckgläschen abgedichtet und mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die Auswertung der Proben erfolgte am konfokalen Laserrasterfluoreszenzmikroskop oder am Fluoreszenzmikroskop. Die Objektträger wurden nach Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Bildbearbeitungen wurden unter Verwendung der Adobe Photoshop CS Software durchgeführt.

2.2.1.15 Rasterelektronenmikroskopische Studien

Das Rasterelektronenmikroskop erlaubt die Untersuchung der Oberflächenmorphologie von Zellen unter Verwendung einer Metallbeschichtung in 20000- bis 150000-facher Vergrößerung. Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Struktur der in dieser Arbeit beschriebenen Gametenfilamente (siehe 3.2.5) wurden 200 µl einer reifen Gametozytenkultur abgenommen und mit 3400 x g für eine Minute abzentrifugiert. Kreisrunde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm wurden mit 70 %igem Ethanol gereinigt und für eine Minute in 0,01 %iger Poly-L-Lysin-Lösung in ddH₂O inkubiert. Nach Trocknung der Deckgläschen wurden sie in die Vertiefungen einer 24-Loch-Mikrotiterplatte transferiert. In nicht belegte Vertiefungen wurde befeuchtetes *Whatman*-Filterpapier gelegt.

Die pelletierten Zellen wurden in Aktivierungslösung 2 resuspendiert und als Tropfen auf die Deckgläschen in der Mikrotiterplatte aufgetragen. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen immer in Lösung befanden und nicht austrockneten. Die Proben wurden für eine Stunde bei RT inkubiert und danach mit einer 6,25 %igen Glutaraldehydlösung in 1 x PBS überschichtet und über Nacht bei 4 °C fixiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal für fünf Minuten mit 1 x PBS gewaschen. Für die Waschschritte und die Dehydrierungsreihe wurden die Lösungen vorsichtig am Rande der Mikrotiterplatten-Vertiefung zugegeben, bis ca. die Hälfte der Vertiefung mit Flüssigkeit bedeckt war. Die Lösungen wurden anschließend wieder vom Rand ausgehend abgenommen. Die Proben wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit aufsteigenden Inkubationszeiten dehydriert. Dafür wurden die Proben nacheinander in 30 %iger Acetonlösung in ddH₂O, 50 %iger Acetonlösung in ddH₂O, 75 %iger Acetonlösung in ddH₂O und 90 %iger Acetonlösung in ddH₂O für je 15, 20, 30 bzw. 45 Minuten inkubiert. Die Dehydrierung wurde mit fünfmaligem Waschen der Proben für je 30 Minuten mit 100 %igem Aceton abgeschlossen. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurden in Trocknungskörbchen gegeben, welche zu $\frac{3}{4}$ mit 100 %igem Aceton befüllt waren. Die Trocknungskörbchen wurden in eine Druckkammer zur Kritischer-Punkt-Trocknung gegeben. Ohne eine Trocknung am Kritischen Punkt (KP) würden große Kräfte bei der Flüssigkeitsverdunstung an der Objekt Oberfläche auftreten, welche das Gewebe deformieren könnten. Die Druckkammer war zunächst zu $\frac{3}{4}$ mit 100 %igem Aceton befüllt, welches sukzessive durch flüssiges CO₂ ersetzt wurde. Das CO₂ besaß eine Temperatur von ca. 5 °C bei einem Druck von ca. 50 bar (Abbildung 2.5, Zustand 1).

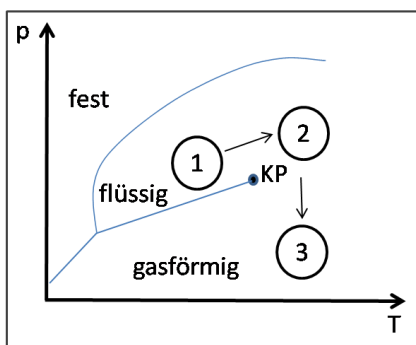


Abbildung 2.5. Phasendiagramm von CO₂ und Prinzip der Kritischer-Punkt-Trocknung. Die Proben befinden sich im Ausgangszustand im flüssigen CO₂ (Zustand 1). Ein Anheben der Temperatur erhöht gleichzeitig den Druck (Zustand 2). Bei konstanter Temperatur wird der Druck erniedrigt, und das CO₂ geht direkt aus dem flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand über (Zustand 3). T, Temperatur; p, Druck; KP, Kritischer Punkt.

Der Kritische Punkt von CO₂ liegt bei 31,1 °C und 73,8 bar. Die Temperatur in der Druckkammer wurde zunächst angehoben auf ca. 40 °C, welches eine Druckerhöhung auf ca. 86-101 bar bewirkte (Zustand 2). Anschließend wurde der Druck durch Öffnen des Druckkammerventils bei konstanter Temperatur von 40 °C langsam auf 1 bar abgesenkt (Zustand 3). Das CO₂ war somit vollständig in den gasförmigen Aggregatzustand übergegangen. Die derart getrockneten Proben wurden auf entsprechenden Objektischen aufgeklebt. Die Objektische wurden in ein *Sputter*-Gerät eingesetzt und bei einer Spannung

von 25 mA für 1,8 Minuten mit 30 nm Goldpartikeln beschichtet. Anschließend wurden die Proben im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die langfristige Lagerung der hygroskopischen Proben erfolgte im Exsikkator unter Luftabschluss.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurde spektrophotometrisch durch Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierzu wurde eine eins zu 70 Verdünnung der zu messenden Nukleinsäure in ddH₂O hergestellt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Absorption bei 280 nm erfasst den Anteil an Aminosäuren mit aromatischen Seitengruppen. Der Quotient aus den beiden Messwerten, A_{260}/A_{280} , gibt Aufschluss über den Grad der Proteinverunreinigung der Probe. Der Messwert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.2.2 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die Vervielfältigung von beliebig ausgewählten DNA-Abschnitten. Für eine PCR-Reaktion wird ein Eltern-DNA-Strang (*template*-DNA) benötigt, kurze DNA-Stränge, deren Sequenzen komplementär zu den angrenzenden 3'- und 5'-Regionen des zu amplifizierenden Genabschnittes sind (Oligonukleotide *sense* und *antisense*), eine hitzestabile DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP oder A, dCTP oder C, dGTP oder G, dTTP oder T), ein an die Polymerase angepasstes Puffersystem sowie eine an die Polymerase angepasste Salzzusammensetzung und Salzkonzentration. Die PCR-Reaktion beginnt mit der Denaturierungsphase der DNA durch Erhitzen auf ca. 95 °C. Das Anlagern der Oligonukleotide an ihre komplementären Sequenzen erfolgt anschließend bei einer Temperaturabkühlung auf ca. zwischen 37 °C und 68 °C (*Annealing*), angepasst an die Sequenzen der Oligonukleotide. Die dritte Phase der DNA-Synthese erfolgt zwischen 60 °C und 72 °C, abhängig vom Temperaturoptimum der DNA-Polymerase und der zu amplifizierenden *template*-DNA (Elongation). Ein Richtwert für die *Annealing*-Temperatur ist die Differenz aus der Oligonukleotiddenaturierungstemperatur (Schmelztemperatur, T_m) und 5 °C. Die Schmelztemperatur lässt sich grob aus der Sequenz der Oligonukleotide mit der Formel $T_m = 2\text{ °C} \times (\text{Anzahl A und T}) + 4\text{ °C} \times (\text{Anzahl G und C})$ berechnen. Diese drei PCR-Phasen werden sequentiell hintereinander zwischen 25 und 45 mal wiederholt und die DNA-Stränge dabei amplifiziert. Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden mit

den DNA-Polymerasen Platinum *Pfx* (Invitrogen), *Green GoTaq* (Promega) oder *Pfu* (Fermentas) durchgeführt. Die dazugehörigen Pipettierschemata und PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2.8 angegeben. Die unterschiedlichen Temperaturen durch die Verwendung eines PCR-Cyclers bereitgestellt.

Tabelle 2.8. Verwendete Komponenten und Bedingungen in PCR-Reaktionen.

Komponente	<i>Pfx</i> Polymerase		<i>Green GoTaq</i> Polymerase		<i>Pfu</i> Polymerase	
	Stock Konz.	Volumina [µl]	Stock Konz.	Volumina [µl]	Stock Konz.	Volumina [µl]
Polymerase-Puffer	10 x	5	5x <i>Green</i>	10	10 x + MgSO ₄	5
Salz	50 mM MgSO ₄	1	25 mM MgCl ₂	4	im Puffer enthalten	-
dNTPs	10 mM	1	100 µM	1	10 mM	1
Oligonukleotid <i>sense</i>	100 pmol/µl	0,8	100 pmol/µl	1	100 pmol/µl	1
Oligonukleotid <i>antisense</i>	100 pmol/µl	0,8	100 pmol/µl	1	100 pmol/µl	1
<i>template</i> gDNA/cDNA	n.d.	0,2/1	n.d.	1,5/1	n.d.	1,5
Polymerase	2,5 u/µl	0,4	5 u/µl	0,25	2,5 u/µl	0,5
Milli-Q ddH ₂ O		40,8		31,75		40,0
Reaktionsvolumen	50		50		50	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	4 min	94 °C	5 min	94 °C	5 min
Phase 1 Denaturierung	95 °C	30 sec	94 °C	40 sec	94 °C	40 sec
Phase 2 <i>Annealing</i>	50 °C	30 sec	50 °C	50 sec	50 °C	50 sec
Phase 3 Elongation	62 °C	1,5 min	60 °C	8 min	60 °C	8 min
Finale Elongation	72 °C	3 min	-	-	-	-
Lagerung	10 °C	unendlich	10 °C	unendlich	10 °C	unendlich
Zyklusanzahl d. Wiederholungen Phase 1-3	33		40		40	

Konz., Konzentration; n.d., nicht detektiert; min, Minuten; sec, Sekunden; u/µl, Einheit (*unit*) pro µl, eine Einheit DNA-Polymerase synthetisiert 100 nmol dNTPs zu DNA in 30 Minuten bei 74 °C.

Die Herstellung von DNA-Konstrukten

Die Amplifizierung der gewünschten Genabschnitte für die in dieser Arbeit generierten *knockout*-Konstrukte wurden unter Verwendung der DNA-Polymerasen *Pfx* (für die Gene von *Calpain*, *GPI8*, *Metacaspase 2* und *Plasmepsin 6*) und *Green Go Taq (PfSub3)* hergestellt. Dabei wurde den *sense*-Oligonukleotiden eine *SacII*-Restriktionsschnittstelle und den *antisense*-Oligonukleotiden eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle zusammen mit einem artifizialen Stopp-Codon hinzugefügt (siehe Tabelle 2.4). Für die Amplifizierung des *PfSub3*-Genabschnittes für die Herstellung von rekombinantem Protein wurden dem *sense*-Oligonukleotid eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle sowie dem *antisense*-Oligonukleotid eine *PstI*-Restriktionsschnittstelle hinzugefügt. Die *Pfu*-DNA-Polymerase wurde zur DNA-Amplifizierung in der entsprechenden PCR-Reaktion eingesetzt. Als *template*-DNA diente für oben genannte PCR-Reaktionen genomische DNA aus asexuellen wildtypischen Parasitenkulturen, die mittels Phenol-Extraktion isoliert wurde (siehe 2.2.2.11). Die korrekte Basenabfolge der in dieser Arbeit generierten Konstrukte wurde durch Sequenzierreaktionen überprüft, deren Ergebnisse dem Anhang auf CD beigefügt sind.

Diagnostische PCR-Reaktionen

Die in dieser Arbeit dokumentierten Transkriptanalysen wurden mittels Reverser-Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Darunter wird die Konvertierung von isolierter RNA zu einzelsträngiger DNA unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase verstanden (*complementary DNA*, cDNA). Die cDNA wird zur Amplifizierung in PCR-Reaktionen eingesetzt. Diese Art von Analyse bezeichnet wird auch als diagnostische PCR bezeichnet, da sie die Anwesenheit von *template*-DNA untersucht und nicht noch zusätzlich die vorhandene Menge der *template*-DNA quantifiziert (im Gegensatz zur *real time*-PCR). Die diagnostischen PCR-Reaktionen für die Transkriptanalysen wurden mit der DNA-Polymerase *Pfx* (Sexualstadien) und *Green GoTag* (asexuelle Parasitenstadien) durchgeführt. Für die diagnostischen PCR-Reaktionen zur Untersuchung der Genloci von isolierter DNA aus KO-Parasitenkulturen dienten ebenfalls die DNA-Polymerasen *Pfx* (für die Gene von *Calpain*, *GPI8*, *Metacaspase 2* und *Plasmepsin 6*) und *Green GoTag (PfSub3)*.

2.2.2.3 Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Die mittels PCR amplifizierten Genabschnitte für die Klonierungen wurden unter Anwendung des *QIAquick PCR Purification Kit* gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Nicht erwünschte Komponenten der PCR-Reaktion oder Restriktionsendonukleasen-Reaktion (z.B. Salze, Puffer) wurden dabei aus der DNA-Probe entfernt. Die DNA-Fragmente wurden mit 30 µl ddH₂O im letzten Schritt eluiert.

2.2.2.4 Der DNA-Verdau

Für die beschriebenen Klonierungen wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente mit gleichen Restriktionsendonukleasen inkubiert, die an spezifischen palindromischen Erkennungssequenzen DNA schneiden ('verdauen'). Dabei entstehen Nukleotid-Überhänge, die das Zusammenfügen der verschiedenen DNA-Fragmente ermöglichen. Ein gerichtetes Einfügen der PCR-DNA in einen Vektor wird durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen erzielt. Die aufgereinigten amplifizierten Genabschnitte aus den PCR-Reaktionen sowie die verwendeten Vektoren pDT_Tg23 und pH902 wurden nach der in Tabelle 2.9 angegebenen Zusammensetzung mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert. Die Puffersysteme wurden gemäß den Herstellerangaben (*New England Biolabs*) ausgewählt.

Tabelle 2.9. Zusammensetzung von DNA-Verdau-Reaktionen.

	Vektor-DNA	DNA aus PCR-Reaktion	Test-Verdau
DNA	3 µg	30 µl	5 µl
Puffer (10 x)	5 µl	5 µl	2 µl
BSA (100 x)	0,5 µl	0,5 µl	0,2 µl
Restriktionsenzym 1	1,5 µl	1,5 µl	0,3 µl
Restriktionsenzym 2	1,5 µl	1,5 µl	0,3 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl	11,5 µl	12,2 µl
Reaktionsansatz	50 µl	50 µl	20 µl

Die *knockout*-Konstrukte wurden unter Verwendung der Restriktionsenzyme SacII und NotI hergestellt. Des Expressionskonstrukt für das rekombinante Protein von PfSub3 wurde mittels der Restriktionsenzyme BamHI und PstI generiert. Nach Ligierung von DNA-Fragmenten wurden die generierten Konstrukte durch Inkubation mit den verwendeten Restriktionsendonukleasen überprüft. Dafür wurde die Vektor-DNA aus den sie amplifizierenden Bakterienzellen unter Anwendung des *QiAprep Spin Miniprep Kits* oder Anwendung einer *Dirty* Mini-Präparation isoliert und mit den jeweiligen Restriktionsenzymen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (siehe Tabelle 2.9, Test-Verdau). Die Reaktion wurde durch Inkubation der Proben bei -20 °C inhibiert. Die Proben wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Für die Klonierungen wurde die Vektor-DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus der Agarose eluiert (siehe 2.2.2.5 und 2.2.2.6). DNA aus PCR-Reaktionen wurde nach Verdau unter Anwendung des *QIAquick PCR Purification Kits* aufgereinigt (siehe 2.2.2.3).

2.2.2.5 Die Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphat-Bausteine negativ geladen. Diese Eigenschaft wird bei der Agarose-Gelelektrophorese ausgenutzt, indem die DNA durch eine Agarose-Matrix im elektrischen Feld aufgetrennt wird. Dabei wandern große DNA- und RNA-Fragmente langsamer zu einer positiven Ladungsquelle durch die Agarose als kleine Fragmente. Die Agarosekonzentration bestimmt die optimale Auftrennung von Nukleinsäuren, abhängig von ihrer Größe. In dieser Arbeit wurden überwiegend 1 %ige Agarosegele verwendet. Die Auftrennung der Fragmente $\leq 1\text{kb}$ aus den diagnostischen PCR-Reaktionen der KO-Parasiten-Analyse erfolgte mit einer Agarosekonzentration von 2 %. Die entsprechende Menge Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TAE-Puffer gelöst und für fünf Minuten unter Rühren abkühlen gelassen. Anschließend wurde die flüssige Agaroselösung in einen abgedichteten Gelschlitten gegossen und ein Plastikkamm zur Aussparung von Einfüllöffnungen eingefügt. Nach Polymerisierung der Agarose bei RT wurde der Plastikkamm entfernt, und die Gelkammer vollständig mit 1 x TAE-Puffer gefüllt. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit je 0,3 μl 6 x Probenpuffer versetzt und in die Einfüllöffnungen gegeben. Bei einer Spannung von 100 V (Midi-1-Kammer) bzw. 200 V (Maxi-Kammer) wurden die Nukleinsäuren für ca. 45 Minuten aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend nach 15-minütiger Inkubation des Gels in einer Ethidiumbromidlösung (eins zu 10000 in ddH₂O) unter UV-Licht analysiert. Die Aufnahmen wurden eingescannt und mit Adobe Photoshop CS Software bearbeitet.

2.2.2.6 Die Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der Restriktionsenzym-verdauten Vektoren-DNA (siehe 2.2.2.4) erfolgte unter Anwendung einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese. Darunter wird die Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese und die anschließende Isolierung der DNA aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel verstanden (siehe 2.2.2.5). Die Isolation der DNA erfolgte durch Ausschneiden der entsprechenden Agarosestücke mit einer sterilen Rasierklinge unter UV-Licht. Die Agarosestücke wurden mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* gemäß den Herstellerangaben aufgelöst und die DNA mit 30 μl ddH₂O eluiert.

2.2.2.7 Die Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (Fermentas), die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3`-Hydroxyl- und 5`-Phosphat-Gruppen in doppelsträngiger DNA katalysiert. Zur Klonierung der Proteasen-KO-

Konstrukte bzw. des Expressionskonstruktes für das rekombinante Protein *PfSub3* wurde die Vektoren-DNA sowie das PCR-Produkt nach Restriktionsenzym-Reaktion und Aufreinigung (siehe 2.2.2.3-2.2.2.6) in einer Ligations-Reaktion zusammengefügt. Von beiden DNA-Produkten wurden je 3 µl auf ein Agarosegel aufgetragen und die Bandenstärke der Ethidiumbromid-gefärbten Nukleinsäuren unter UV-Licht verglichen. Die DNA-Fragmente wurden in gleichen Mengenverhältnissen von 1 bis 3 µl in den Ligationsansätzen eingesetzt. Der Reaktion wurden 2 µl 10 x Ligasepuffer sowie 1 µl T4-Ligase zugesetzt. Die Reaktion wurde mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt und bei RT für zwei Stunden inkubiert. 2 µl des Ansatzes wurden anschließend in kompetente *OneShot-Top10 E.coli* Zellen transformiert, oder über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag transformiert (siehe 2.2.1.4).

2.2.2.8 Die Plasmidisolierung aus Bakterien

Nach Transformation von DNA in kompetente Bakterien (2.2.1.4) wurden diese entsprechend zur Amplifizierung der Plasmid-DNA kultiviert (siehe 2.2.1.2). Sollte die zu isolierende DNA in großen Mengen hergestellt werden, oder diene sie der Transfektion von *P. falciparum*, so wurden die Bakterien in 1 l Medium kultiviert und anschließend mit dem *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die pelletierte DNA wurde am Ende in 200 µl ddH₂O aufgenommen. Für die Transformation von Plasmid-DNA in *P. falciparum* wurde die DNA dagegen in 600 µl Cytomix-Puffer unter sterilen Bedingungen aufgenommen. War die benötigte Menge reiner DNA kleiner für z.B. den Einsatz in Sequenzierreaktionen, wurden die Bakterien in einem Volumen von 3 ml kultiviert und die DNA anschließend mit dem *QiAprep Spin Miniprep Kit* gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl ddH₂O. Diente die DNA wiederum der Durchführung eines Test-Verdaus nach erfolgter DNA-Ligation (siehe 2.2.2.4), so wurden die transformierten Bakterienzellen ebenfalls in einem Volumen von 3 ml kultiviert und die DNA mittels einer *Dirty Mini*-Präparation unter Verwendung der Puffer 1-3 des *QiAprep Spin Miniprep Kits* isoliert. Dafür wurden 1,2 ml der Bakterienkultur in ein 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute mit 3400 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 250 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer 2 wurde der Ansatz durch viermaliges Invertieren gemischt. Anschließend wurden 350 µl Puffer 3 hinzugeben und die Probe erneut invertierend gemischt. Der Ansatz wurde für zehn Minuten mit 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt, 750 µl Isopropanol hinzugegeben und 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die derart gefällte DNA mit 16000 x g für 15 Minuten in der Zentrifuge pelletiert. Auf das DNA-Pellet wurden 500 µl 70 %ige Ethanollösung in ddH₂O

gegeben und die DNA anschließend mit 16000 x g für zehn Minuten abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in dem 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel bei RT getrocknet und schließlich in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Für einen Testverdau wurden 5 µl der *Dirty Mini*-Präparation eingesetzt (siehe 2.2.2.4). Die Lagerung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.9 Die Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die DNA-Basenabfolge der in dieser Arbeit hergestellten KO-Konstrukte (3.1.2.2) und des Expressionsvektorkonstruktes für rekombinantes Protein (siehe 3.1.2.3) wurden in Sequenzierreaktionsansätzen unter Anwendung der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) überprüft. Die Methode der DNA-Sequenzierung basiert auf dem Prinzip der PCR, mit dem Unterschied, dass nur ein Oligonukleotid eingesetzt wird und fluoreszenzgekoppelte Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) neben dNTPs verwendet werden. Die ddNTPs sind mit vier verschiedenen Fluoreszenz-Markierungen, entsprechend ihrer Nukleobase, versehen. Der Einbau eines ddNTPs lässt die DNA-Strang-Synthese abbrechen, was nach dem Zufallsprinzip erfolgt. Nach erfolgter PCR-Reaktion werden die unterschiedlich langen DNA-Stränge im Sequenziergerät analysiert, und so die Basenabfolge der DNA abgelesen.

Für die Sequenzierreaktion-PCR wurde die Plasmid-DNA mit den Komponenten des *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* nach dem in Tabelle 2.10 angegebenen Pipettierschema zusammengegeben. Anschließend wurden die Proben im PCR-Cycler unter den angegebenen Bedingungen inkubiert.

Tabelle 2.10. Verwendete Komponenten und Bedingungen in PCR-Reaktionen für Sequenzierungen.

PCR-Komponente	Volumina	PCR-Phase	Temperatur	Zeit
5 x Premix	2 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	4 min
5 x Puffer	2 µl	Phase 1 Denaturierung	96 °C	30 sec
Plasmid-DNA	0,4 µg	Phase 2 <i>Annealing</i>	50 °C	30 sec
100 pmol/µl Oligonukleotid	0,5 µl	Phase 3 Elongation	62 °C	4 min
ddH ₂ O	ad 10 µl	Finale Elongation	72 °C	3 min
		Lagerung	4 °C	unendlich
		Anzahl der Zyklus-Wiederholungen Phase 1-3	25	

Die Komponente Premix enthält unter anderem die Polymerase zur Synthese der DNA-Stränge, sowie dNTPs und fluoreszenzgekoppelte ddNTPs. Die Proben wurden nach erfolgter PCR-Reaktion in 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäße überführt und von den Komponenten der PCR-Reaktion gereinigt. Dafür wurden zu den Proben 90 µl ddH₂O, 10 µl einer dreimolaren Natriumacetatlösung (pH 4,6) und 250 µl 100 %ige Ethanollösung

gegeben. Anschließend wurde die DNA bei Zentrifugation mit 16000 g für 15 Minuten gefällt. Auf das DNA-Pellet wurden 700 µl einer 70 %igen Ethanollösung in ddH₂O gegeben und die DNA anschließend mit 16000 x g für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abgenommen, das DNA-Pellet in dem Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel für zehn Minuten bei RT getrocknet und schließlich in 25 µl Formamid aufgenommen. Die Basenabfolge der Proben wurden mit Hilfe von Frau B. Plaschke unter Verwendung des Sequenziergerätes analysiert. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen sind dem Anhang auf CD beigefügt und wurden mit den Programmen NCBI BLAST, Clustal W2 und BioEdit in Hinblick auf ihre korrekte Basenabfolge überprüft.

2.2.2.10 Die Isolation von RNA und Herstellung von cDNA

Für die in dieser Arbeit dokumentierte Transkriptanalyse (siehe 3.1.2.1) wurde die Gesamt-RNA aus Parasitenstadien isoliert und das Vorhandensein bestimmter Gentranskripte mittels RT-PCR überprüft. Für asexuelle Parasitenstadien wurde die Zelllinie F12 verwendet, die keine Gametozyten ausbildet (Alano *et al.*, 1995). Für die übrigen Parasitenstadien wurde das *Plasmodium*-Isolat NF54 kultiviert. Asexuelle Parasitenstadien, Gametozyten, Gameten und Zygoten (entsprechend der Kultivierung in einer 75 cm²-Zellkulturflasche) wurden wie in Kapitel 2.2.1.12 beschrieben aufgereinigt und das Zellpellet in ein 2-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml Trizol (Invitrogen) mehrmals kräftig resuspendiert und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Das Zellgemisch wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, für 30 Sekunden mit dem Vortex gemischt und für zehn Minuten bei RT unter leichter Bewegung auf der Wippe inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe mit 16000 x g bei 4 °C für 15 Minuten bildeten sich drei Phasen aus. Die oberste RNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein frisches 2-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Isopropanol zugegeben. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei RT unter Bewegung auf der Wippe mit anschließender Zentrifugation mit 16000 x g für 15 Minuten bei 4 °C. Die RNA wurde am Rande des Reaktionsgefäßes als gelähnliches Pellet sichtbar. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet mit 1 ml 75 %iger Ethanollösung in RNase-freiem ddH₂O überschichtet. Die Probe wurde auf dem Vortex für zehn Sekunden gemischt und mit 7500 x g bei 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde erneut abgenommen und die RNA in dem Reaktionsgefäß bei geöffnetem Deckel für fünf Minuten bei RT getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 50 µl RNase-freies ddH₂O resuspendiert und für zehn Minuten bei 60 °C inkubiert. Zur Messung der RNA-Konzentration wurde eine eins zu 70 Verdünnung der RNA in 10 mM TrisHCl (pH 7,0) hergestellt (siehe 2.2.2.1). Die RNA wurde bei -20 °C aufbewahrt, oder direkt weiterverwendet. Für die Synthese der cDNA wurden je 2 µg RNA unter Anwendung

des *RNAse free DNase Kits* (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben von genomischer DNA befreit. Die RNA wurde anschließend von den Komponenten des Kits gereinigt. Dafür wurden 250 µl RNase-freies ddH₂O, 150 µl Phenol und 150 µl Chloroform der RNA-Lösung zugegeben und für fünf Minuten unter Bewegung auf der Wippe bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 16000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Die oberste RNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein frisches 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt, 300 µl Chloroform zugegeben und für fünf Minuten unter Bewegung auf der Wippe bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 16000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Die oberste RNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein frisches 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt, 30 µl einer dreimolaren Natriumacetatlösung (pH 4,6) und 1 ml einer 100 %igen Ethanollösung hinzugegeben. Die Proben wurden auf Eis für 50 Minuten inkubiert und anschließend für 20 Minuten mit 16000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die pelletierte RNA wurde mit 1 ml einer eiskalten 75 %igen Ethanollösung in RNase-freiem ddH₂O überschichtet und auf dem Vortex gemischt. Die RNA wurden mit 7500 x g für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert und anschließend mit geöffnetem Deckel bei RT für fünf Minuten getrocknet. Anschließend wurde die RNA in einem Volumen von 40 µl in RNase-freiem ddH₂O resuspendiert. Die reverse Transkription der RNA zu cDNA wurde unter Verwendung des *SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden je 10 µl der 50 ng/µl konzentrierten RNA-Proben in einer RT-Reaktion eingesetzt. Die cDNA-Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt. Es wurden zur Durchführung der Transkriptanalyse je 1 µl der cDNA-Proben in einer PCR-Reaktion eingesetzt (siehe 2.2.2.2).

2.2.2.11 Die Isolation genomischer DNA aus *P. falciparum*

Die Isolation genomischer DNA (gDNA) aus *P. falciparum* wurde an den Proteasen-KO-Parasiten-Kulturen durchgeführt, um die jeweiligen Genloci zu analysieren (siehe 3.1.2.2). Hierfür wurde die Parasitenkultur mit einer Parasitämie von 1-3 % in ein 15-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt und für fünf Minuten bei 1300 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml einer 2 %igen Saponinlösung in 1 x PBS resuspendiert und zur Erythrozytenlyse für zehn Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten mit 1300 x g zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand verworfen. Die Parasiten wurde in 30 ml 1 x PBS resuspendiert, und mit 1300 x g für zehn Minuten abzentrifugiert. Das schwarze Zellpellet wurde anschließend in 200 µl 1 x PBS resuspendiert. Die weitere Aufreinigung der genomischen DNA erfolgte unter Verwendung des *QIAamp Blood Mini Kits* gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde in 50 µl ddH₂O gelöst.

Weiterhin wurde von Frau L.Sologub genomische DNA aus wildtypischen Parasitenkulturen zur Gewinnung von *template*-DNA für die Klonierungsschritte der *knockout*-Konstrukte und des Expressionskonstruktes isoliert (siehe 3.1.2.3). Hierfür wurden 40 ml einer wildtypischen Parasitenkultur mit einer Parasitämie von 3-5 % für fünf Minuten mit 1300 x g abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in 5 ml 1 x PBS resuspendiert und zur Erythrozytenlyse für fünf Minuten in 75 µl einer 10 %igen Saponinlösung in 1 x PBS inkubiert. Die Parasiten wurden anschließend für fünf Minuten mit 1300 x g zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und für fünf Minuten mit 1300 x g abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Lyse in 500 µl TSE, 100 µl einer 10 %igen SDS-Lösung in ddH₂O sowie 50 µl einer sechsmolaren Natriumperchloratlösung über Nacht schüttelnd inkubiert. Die DNA-Isolation erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion. Hierfür wurde ein Volumenanteil Phenol zur Zellsuspension hinzugegeben, die Probe für fünf Minuten schüttelnd inkubiert und anschließend für fünf Minuten mit 16000 x g abzentrifugiert. Die oberste DNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein frisches 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt und mit je einem halben Volumenanteil Phenol und Chloroform versetzt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei RT wurde die Probe für fünf Minuten mit 16000 x g abzentrifugiert. Die oberste, DNA-enhaltende wässrige Phase wurde erneut abgenommen und in ein frisches 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde mit einem Volumenanteil Chloroform versetzt, anschließend für fünf Minuten inkubiert und mit 16000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz zur DNA-Fällung mit zwei Volumenanteilen 100 %igem Ethanol versetzt, fünf Minuten unter Schütteln inkubiert und mit 16000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit einer eiskalten 70 %igen Ethanolösung in ddH₂O überschichtet und durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gewaschen. Die DNA wurde mit 16000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes für fünf Minuten getrocknet und in 20 µl ddH₂O resuspendiert. Die DNA wurde anschließend für fünf Minuten zwischen 55-60 °C inkubiert. Die DNA-Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Die Expression rekombinanter Proteine

Die in dieser Arbeit durchgeführte Proteinexpression eines rekombinanten Proteins von *PfSub3* (siehe 3.1.2.3) erfolgte mit Hilfe des Expressionskonstrukts pIH902 (Abbildung 2.1B). Die Proteinexpression steht in diesem Konstrukt unter der Kontrolle des starken P_{lac}-Promotors, der wiederum von einer Komponente des *lac*-Operons gesteuert wird. Ohne die Zugabe von IPTG unterbindet der *lac*-Repressor, kodiert vom *lacI* Gen, die Synthese des

rekombinanten Proteins. Das rekombinante Protein wird vor die Sequenz des *malE* Gens kloniert, welches für das Maltose-Binde-Protein (MBP) kodiert. Die exprimierten rekombinanten Proteine werden somit als Fusionsproteine mit dem angehängten MBP-Protein hergestellt und lassen sich daher einfach über das MBP-Protein aufreinigen. Nach Klonierung des Expressionskonstrukts wurde die Expression von MBP-Sub3 in kleinem Maßstab mittels Miniexpression in *E. coli* BL21-(DE3)-RIL-Zellen untersucht. Anschließend wurde ein Bakterienklon zur Überexpression des rekombinanten Proteins in großem Maßstab ausgewählt (Maxiexpression).

Die Miniexpression

Die Miniexpression rekombinanter Proteine im bakteriellen System diente im Rahmen dieser Arbeit der Expressionsanalyse des neu klonierten Expressionskonstrukts pH902 mit integriertem *PfSub3* Genabschnitt. Dazu wurde das Expressionskonstrukt in *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL-Expressionszellen transformiert (siehe 2.2.1.4), auf LB_{amp}-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht kopfüber bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden drei einzelne Bakterienklone mit einer sterilen Pipettenspitze in 5 ml LB_{amp}-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Kulturen in Doppelansätzen eins zu 20 mit LB_{amp}-Medium verdünnt und weitere 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5. Dafür wurde in einem der Doppelansatz-Röhrchen durch Zugabe von 0,75 mM IPTG die Proteinexpression induziert (+IPTG), während das zweite Röhrchen ohne Zugabe von IPTG ausschließlich als Negativkontrolle mitgeführt wurde (-IPTG). Die Zellen wurden bei 30 °C für sechs Stunden schüttelnd inkubiert. Dabei wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) der Bakterienzellen zweimal bestimmt, zu überprüfen, ob das überexprimierte rekombinante Protein einen toxischen Effekt auf die Bakterienzellen ausübte. Nach der Inkubationszeit wurden je 500 µl abgenommen, mit 3400 x g für eine Minute abzentrifugiert, und die Zellen in der Hälfte des Flüssigkeitsüberstandes (250 µl) erneut resuspendiert. Ein Aliquot von je 25 µl der Proben wurde im Verhältnis eins zu eins mit 2 x Probenpuffer und 25 mM DTT versetzt und zur Denaturierung der Proteinstruktur zehn Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurden danach zur Analyse auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen (siehe 2.2.3.4) und nach dem Gellauf gefärbt (siehe 2.2.3.5).

Die Maxiexpression

Nach erfolgreicher Miniexpression des rekombinanten Proteins MBP-Sub3 und der Bestätigung der korrekten Basenabfolge des klonierten Genabschnitts im Expressionskonstrukt durch eine Sequenzierungsreaktion (siehe Kapitel 2.2.2.9; sowie Anhang auf CD) wurde das rekombinante Protein in großem Maßstab mittels Maxiexpression

hergestellt. Zusätzlich wurde rekombinantes Protein des MBP-Proteins hergestellt durch Verwendung des 'leeren' Vektors pIH902. Die rekombinanten Proteine dienen anschließend der Herstellung von polyklonalen Antikörpern. Für die Maxiexpression wurde das klonierte Expressionskonstrukt und der leere Vektor pIH902 in *E.-coli*-BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL-Expressionszellen transformiert (siehe 2.2.1.4) und die Zellen anschließend direkt in 5 ml LB_{amp}-Medium transferiert. Die Bakterienkulturen wurden schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden am nächsten Tag eins zu 1000 in 1 l LB_{amp}-Medium verdünnt und für sechs Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression in den Kulturen mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Bakterienkulturen wurden weitere vier Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 20 Minuten mit 5000 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Die Proben wurden in 100 ml 1 x PBS resuspendiert und erneut für 20 Minuten mit 5000 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Die Bakterienzellen wurden bei -20 °C bis zur Proteinaufreinigung (siehe 2.2.3.2) aufbewahrt.

2.2.3.2 Die Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Aufreinigung der im Bakteriensystem hergestellten rekombinanten Proteine MBP-Sub3 und MBP (siehe 2.2.3.1) erfolgte über das Maltose-Binde-Protein unter Anwendung von Amylose-beladenen Säulen und anschließender Elution mit Maltose-haltigen Puffern. Die nach erfolgter Maxiexpression bei -20 °C gelagerten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und das Zellpellet gewogen. Pro Gramm Bakterienpellet wurden 3 ml Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden weiterhin mit 80 µl einer 10 g/ml konzentrierten Lysozymlösung versetzt, vorsichtig resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden in auf Eis gekühlten 50-ml-Einmal-Reaktionsgefäße überführt. Mit Hilfe einer *French pressure cell* wurden die Zellen bei einem Druck von 1200 psi in drei Zyklen aufgebrochen und die DNA durch zweiminütige Ultraschallbehandlung und einer Intensität von 50 % in der Einstellung 'Zyklus 50' zerstört. Pro Milliliter des Probenvolumens wurden 6 µl einer auf 4 °C temperierten, einmolaren MgCl₂-Lösung und 0,08 g NaCl je Ansatz zugegeben. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend mit 4000 x g für 20 Minuten bei 4 °C. Währenddessen wurde je Ansatz 1 ml Amylose (*New England Biolabs*) mit 30 ml Waschpuffer in einem frischen 50-ml-Einmal-Reaktionsgefäß vermischt und mit 1300 x g für zehn Minuten abzentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde verworfen und die Amylose in 2,5 ml TE-Puffer resuspendiert. Der Flüssigkeitsüberstand aus der Zentrifugation der lysierten Bakterienzellen wurde zur Amylose hinzugefügt und das Volumen mit TE-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden zur Bindung der Amylose an das MBP-Protein über Nacht auf dem Rotator-Mixer bei 4 °C unter Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Amylose-Proteingemisch auf

eine Chromatographiesäule (Biorad) geladen und mit 30 ml Waschpuffer gewaschen. Die rekombinanten Proteine wurden anschließend durch Zugabe von 8 ml Elutionspuffer aus der Säule eluiert. Dabei wurde der Maltose-enhaltende Elutionspuffer in 500- μ l-Aliquots auf die Säule gegeben und die rekombinanten Proteine je Ansatz in 16 Einzelfraktionen à 500- μ l-Aliquots gesammelt. Von jeder Fraktion wurden 20 μ l abgenommen und mit 20 μ l 2 x Probenpuffer und 25 mM DTT vermischt. Diese Proben wurden für zehn Minuten bei 65 °C inkubiert und zur Analyse auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach Färbung des Gels (siehe 2.2.3.5) wurde die Reinheit der Proteinaufreinigung untersucht sowie analysiert, in welchen Fraktionen der Hauptteil der rekombinanten Proteine eluiert wurde. Diejenigen Fraktionen, die ähnliche Proteinkonzentrationen aufwiesen, wurden miteinander vereint. Für das MBP-Sub3-Protein wurden die Fraktionen 1-5, 6 und 7, 8-10 und 11-16 vereint. Für das MBP-Protein wurden die Fraktionen 1-3, 4 und 5 und 6-8 miteinander vereint. Die Proteinkonzentration der vereinten Fraktionen wurde anschließend mittels SDS-Page-Analyse und Gelfärbung bestimmt (siehe 2.2.3.5). Die rekombinanten Proteine wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 Die Vorbereitung von Proteinproben für Western-Blot-Studien

Aufgereinigte rekombinante Proteine und aufgereinigte Parasitenstadien wurden in dieser Arbeit mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.3.4) und anschließenden Western-Blot-Studien (siehe 2.2.3.7) untersucht. Pro Geltasche wurden von aufgereinigten rekombinanten Proteinen 12 ng Proteinprobe mit 15 μ l 2 x Probenpuffer und 25 mM DTT versetzt und für zehn Minuten bei 90 °C erhitzt. Aufgereinigte Parasitenstadien wurden mit 1 x NETT-Puffer auf eine Parasitenkonzentration von 1×10^6 Parasiten pro Mikroliter eingestellt. Zu den resuspendierten Parasiten wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma) im Verhältnis 1:100 zugegeben. Pro Geltasche wurden von den Parasitenproben je 2,5 μ l (entsprechend $2,5 \times 10^6$ Parasiten) mit 15 μ l 2 x Probenpuffer und 25 mM DTT versetzt und für zehn Minuten bei 90 °C erhitzt.

Für die unter 3.2.5 beschriebenen Untersuchungen an der GFP-exprimierenden Parasitenlinie 5'CAM.GFP wurden 4×10^7 aufgereinigte asexuelle Parasitenstadien in 15 μ l TE-Puffer resuspendiert und für zehn Minuten bei -80 °C inkubiert. Die gefrorenen Parasiten wurden anschließend im Wasserbad bei 42 °C aufgetaut und im Anschluss daran wieder für zehn Minuten bei -80 °C inkubiert. Dieser Vorgang der Zerstörung der Zellstruktur wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Die Proben wurden nach dem letzten Auftauvorgang mit 16000 x g für zehn Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dies stellte die lösliche, zytoplasmatische Zellfraktion der Proben dar. Die pelletierten Zellbestandteile wurden in 15 μ l TE-Puffer resuspendiert und mit 16000 x g bei 4 °C

abzentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abgenommen, die Zellen erneut in 15 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend mit 16000 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Nach Abnahme des Flüssigkeitsüberstandes wurde das Pellet in 15 µl 1 x NETT resuspendiert und Protease-Inhibitor-Cocktail im Verhältnis eins zu 100 hinzugegeben. Dies stellte die unlösliche, membranöse Zellfraktion der Proben dar. Von beiden Zellfraktionen wurden pro Geltasche je 2 µl mit 3 µl 1 x NETT-Puffer, 5 µl 2 x Probenpuffer und 25 mM DTT versetzt und für zehn Minuten bei 65 °C erhitzt. Derart vorbereitete Proben wurden mittels SDS-PAGE-Analyse und anschließenden Western-Blot-Studien untersucht (siehe 3.1.2.4 und 3.2.6).

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Technik zur Auftrennung von Proteingemischen in ihre Einzelkomponenten in Abhängigkeit von ihrer Größe. Dabei werden die Proteingemische unter Verwendung des stark anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) mit einer negativen Ladung versehen und wandern im elektrischen Feld Richtung Anode. Das ebenfalls eingesetzte Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol reduziert in den Proteinen vorhandene Disulfidbrücken und ermöglicht ebenso die Auftrennung der linearisierten Proteine. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine ist dabei abhängig vom Molekulargewicht des jeweiligen Proteins. Leichtere Proteine können sich schneller durch die verwendete Matrix aus Polyacrylamid (PAA) bewegen als schwerere. Je nach Proteingemisch wird die PAA-Konzentration an die zu untersuchenden Einzelkomponenten angepasst, um eine optimale Auftrennung und Analyse der Proteine zu gewährleisten. Je kleiner das zu untersuchende Protein ist, desto größer sollte die PAA-Konzentration des Gels sein. Bei der SDS-PAGE-Analyse wird ein Trenngel verwendet, in dem sich die Proteine entsprechend ihrer Größe auffächern, welches mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet wird. Das Trenngel sorgt für eine einheitliche Lauffront und einen einheitlichen Start der Proteine vor dem Übergang zum Trenngel. Die in dieser Arbeit durchgeführten SDS-PAGE-Analysen der Mini- und Maxiexpression sowie Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte mittels 12 %iger Trenngele. Die SDS-PAGE-Analyse mit anschließenden Western-Blot-Studien erfolgte unter Verwendung 10 %iger Trenngele. Als Polymerisationsstarter wurde 10 % APS und als Radikalstabilisator TEMED verwendet. Beide Komponenten wurden erst kurz vor dem Gießen der Gele in die entsprechenden Puffermischungen (siehe 2.1.4) gegeben, um ein vorzeitiges Polymerisieren der Lösung zu verhindern. Zuerst wurde die Puffermischung für das Trenngel in eine Mini-Protean-3-Station zwischen zwei abgedichteten Glasplatten gegossen, die einen Zwischenraum von 1,0 mm umschlossen. Danach wurde der Ansatz mit ca. 2 ml ddH₂O überschichtet und für

20 Minuten bei RT auspolymerisiert. Anschließend wurde das ddH₂O durch die Sammelgellösung ausgetauscht und ein Kamm zur Taschenbildung in die Lösung gesteckt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT wurde das polymerisierte Gel in eine Mini-Protean-3-Apparatur eingespannt und der Kamm nach Füllung der Elektrophoresekammer mit 1 x Laufpuffer entfernt. Die vorbereiteten Proteinproben (siehe 2.2.3.3) wurden anschließend in die Taschen gefüllt. Als Kontrolle diente ein Molekulargewichtsstandard mit Proteinen bekannter Größe (siehe 2.1.9). Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 15 Minuten bei 85 V und für weitere eineinhalb Stunden bei 125 V. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteingemische entweder gefärbt (siehe 2.2.3.5) oder für Western-Blot-Studien weiterverwendet (siehe 2.2.3.7).

2.2.3.5 Die Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach erfolgter SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurden die Gele dreimal für fünf Minuten in ddH₂O unter Bewegung auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurden die Gele für eine Stunde in *GelCode-Blue-Stain* und danach in ddH₂O schüttelnd bei RT inkubiert. Die Inkubation in ddH₂O erfolgte solange, bis die überschüssige Färbelösung entfernt und klare Proteinbanden sichtbar wurden. Die Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Proteine (siehe 3.1.2.3; Abbildung 3.8) erfolgte in einer groben Näherung durch Vergleichen der Farbdichte der gewünschten Proteinbanden im Vergleich zum verwendeten Protein-Größenstandard. Es wurden 5 µl des Proteingrößenstandards aufgetragen, welches 0,75 µg Protein entsprach. Von den zu untersuchenden rekombinanten Proteinlösungen wurden je 0,1 µl, 0,2 µl, 0,5 µl, 1 µl, 2 µl und 3 µl aufgetragen. Die Proteinbandenstärke des rekombinanten Proteins wurde anschließend mit den Proteinbanden des Größenstandards verglichen und die Konzentration bestimmt. Die Trocknung der gefärbten Gele erfolgte durch Inkubation in 20 %iger Ethanollösung mit 10 % Glycerin in ddH₂O für eine halbe Stunde. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei in ddH₂O gequollenen Zellophanfolien für zwei Tage in einen Gelrocknungsrahmen gespannt.

2.2.3.6 Die Gewinnung von Immunsereen

Die Herstellung rekombinanter Proteine und deren Aufreinigung (siehe 2.2.3.1 und 2.2.3.2) diente der Gewinnung von Immunsereum für weiterführende Proteinexpressionsstudien von PfSub3 (siehe 3.1.2.4). Für die Gewinnung von Immunsereum wurden drei Mäuse mit je 100 µg rekombinantem Protein von MBP oder MBP-Sub3 immunisiert. Dafür wurden 300 µg rekombinantes Protein in steril filtriertem 1 x PBS aufgenommen und in einem Endvolumen von 500 µl in einem eins-zu-eins-Verhältnis mit Freund's-*incomplete*-Adjuvans versetzt. Das

Gemisch wurde anschließend weiblichen, sechs Wochen alten NMRI-Mäusen subdermal injiziert. Die Injektion des Proteingemisches sowie die anschließende Gewinnung des Immunerums wurden von Frau L. Sologub und Frau Dipl.-Biol. N. Simon übernommen. Vier Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgte eine zweite Immunisierung mit je 50 µg Proteingemisch in Adjuvans pro Maus. Nach zehn weiteren Tagen wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin gemäß Herstellerangaben betäubt, und es erfolgte die anschließende Blutung der Mäuse durch eine Herzmuskelpunktur. Das gewonnene Blut umfasste ca. 1,5 ml und wurde zur Gerinnung in ein Serumröhrchen mit Trennmittel (Sarstedt) für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit 3000 x g zentrifugiert. Das Serum wurde oberhalb der Trennschicht abgenommen, in 1,5-ml-Einmal-Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Parallel zur Eigenproduktion polyklonaler Mausseren wurde die Synthese eines polyklonalen Peptidantikörpers von PfSub3 bei der Firma Biogenes (Berlin) in Auftrag gegeben. Es wurden zwei Mäuse mit einem 14 Aminosäuren umfassenden Peptid (Aminosäuresequenz TSPYTLKLRDRNKY) immunisiert. Die Immunisierung der Tiere erfolgte dabei viermal in einem Zeitraum von 49 Tagen. Die gewonnenen Seren α -Sub3-Peptidantikörper 1 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 wurden getrennt untersucht und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.7 Die Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse stellt eine Technik dar, mit Hilfe derer spezifisch ein bestimmtes Protein in einem mittels SDS-Page aufgetrennten Proteingemisches detektiert werden kann. Dabei wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran unter Anwendung von elektrischer Spannung transferiert und das spezifische Protein durch Immunmarkierung sichtbar gemacht. Dazu wurde auf eine Transfertasche einer Mini-Trans-Blot-Apparatur zunächst ein in Transferpuffer getränkter Schwamm gelegt, gefolgt von zwei in Transferpuffer getränkten *Whatman*-Filterpapieren. Anschließend wurde das Trenngel aus der SDS-PAGE-Analyse (siehe 2.2.3.4) und danach eine Nitrozellulosemembran Hybond ECL aufgelegt. Abschließend wurden zwei weitere *Whatman*-Filterpapiere und ein weiterer Schwamm in die Apparatur geschichtet. Beim Aufbau wurde stets auf eine luftblasenfreie Schichtung geachtet. Nach Schließen der Transfertasche wurde diese in die entsprechende Halterung eingesetzt, in den Puffertank gegeben und zusammen mit einem Kühlelement mit Transferpuffer überschichtet. Der Proteintransfer erfolgte nach dem *wet*-Prinzip bei 15 V über Nacht. Die Membran wurde in eine Plastikschiene überführt, einmal in 1 x TBS gewaschen, und in Ponceau-S-Lösung für ca. zwei Minuten inkubiert. Nach Erscheinen von Proteinbanden wurde die Membran kurz in ddH₂O gespült, vorsichtig in eine Plastiktüte transferiert und das Bandenmuster gescannt.

Material und Methoden

Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 1 % BSA in 5 % TBSM für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für zehn Minuten mit 1 x TBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran mit den entsprechenden in 1 x PBS verdünnten Primärantikörpern (siehe Tabelle 2.6). Dafür wurde die Membran mit 300-800 µl Immunsereum mittels eines Vakuum-Folienschweißgerätes in Plastikfolientüten eingeschweißt bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal für fünf Minuten in 3 % TBSM gewaschen. Die Inkubation mit dem an Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper, verdünnt in 1 x PBS, erfolgte ebenfalls in Plastiktüten über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit 1 x TBS gewaschen. Anschließend wurde sie für drei Minuten in Equilibrierungspuffer inkubiert, bevor die Immundetektion erfolgte. Dafür wurde eine Tablette des Substrates NBT/BCIP der Alkalischen Phosphatase in 10 ml ddH₂O gelöst und die Membran damit inkubiert. Nach Auftauchen von Proteinbanden wurde die Reaktion durch Eintauchen der Membran in Stopp-Puffer inhibiert. Abschließend wurde die Membran zwischen zwei Lagen *Whatman*-Filterpapier getrocknet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von Proteasen während der Gametogenese von

P. falciparum

3.1.1 Studien unter Verwendung von Protease-Inhibitoren

3.1.1.1 Die Wirkung von Protease-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation

Um die Beteiligung von Proteasen während der Gametogenese näher zu untersuchen, wurde die Wirkung ausgesuchter Protease-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation analysiert. Die verwendeten Protease-Inhibitoren sind aufgeführt in Tabelle 2.5A und eingeteilt in die inhibierten Proteasekategorien. Im Anhang befindet sich eine Übersicht der Strukturformeln der ausgewählten Inhibitoren (Abbildung 7.1). In jeder Proteasekategorie wurden mindestens zwei Protease-Inhibitoren ausgewählt. Für die Analyse wurden reife Gametozytenkulturen aktiviert und gleichzeitig mit der entsprechenden Konzentration zwischen 25 μM und 1 mM des jeweiligen Inhibitors für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (siehe 2.2.1.10). Alternativ dazu wurden die Gametozytenkulturen zusätzlich vor der Aktivierung für 15 Minuten mit der entsprechenden Konzentration des jeweiligen Inhibitors unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Mikrogametozytenexflagellation mittels Exflagellationsinhibitionsassays lichtmikroskopisch untersucht. Es wurde dabei die Anzahl der Exflagellationszentren in je 30 Gesichtsfeldern drei unabhängiger Ansätze bestimmt. Die Anzahl der Exflagellationszentren wurde in Relation zu Inhibitor-unbehandelten Kontrollen gesetzt, die mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel der Inhibitoren unter gleichen Bedingungen inkubiert worden waren (0 μM Kontrolle). Die Durchführung der Exflagellationsinhibitionsassays erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau cand. biol. R. Bosse. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der Analysen mit den entsprechenden IC_{50} -Werten der Inhibitoren aufgeführt und in Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse der Mittelwerte der jeweiligen Inhibitor-Konzentrationen graphisch dargestellt. Die Originaldaten mit den dazugehörigen Standardabweichungen sind dem Anhang beigelegt (Tabelle 7.1A-C).

Die Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren TLCK und TPCK inhibieren die Mikrogametozytenexflagellation bei 75 μM respektive 100 μM zu 100 %. Bei einer Konzentration von 12,6 μM bzw. 16,1 μM ist eine Reduktion der Mikrogametozytenexflagellation um 50 % zu verzeichnen. Unter Verwendung des Cystein-/Serinprotease-Inhibitors PMSF in einer Konzentration von 500 μM mit Vorinkubation ist noch eine 2,2 %ige Mikrogametozytenexflagellation zu beobachten, die bei einer Konzentration von 1 mM zu 100 % gehemmt wird. Bei einer Konzentration von 211,2 μM ist eine Reduktion der Exflagellation um 50 % zu verzeichnen. Die Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren Leupeptin

Ergebnisse

und Antipain zeigen keinen Effekt auf die Mikrogametozytenexflagellation bzw. auf daran beteiligte Proteasen. Die Cysteinprotease-Inhibitoren und ebenso spezifisch Falcipainehemmenden Inhibitoren bADA und RV112D reduzieren die Mikrogametozytenexflagellation mit Vorinkubation in einer Konzentration von 100,2 μM bzw. 157,6 μM . Bei einer Konzentration von 1 mM ist die Exflagellation auf 1,9 % bzw. 15,2 % abgefallen. Der Cysteinprotease-Inhibitor E-64 und dessen membranpermeable Variante E-64d inhibieren die Mikrogametozytenexflagellation nicht. Unter Verwendung des Metalloprotease-Inhibitors 1,10-Phenanthrolin ist eine Reduktion der Exflagellation um 50 % bei einer Konzentration von 33,2 μM zu verzeichnen. Bei einer Konzentration von 1 mM exflagellieren nur noch 2,4 % der Mikrogametozyten. Der Metalloprotease-Inhibitor Phosphoramidon zeigt keinen Effekt auf die Mikrogametozytenexflagellation. Der Einsatz des Aspartatprotease-Inhibitors EPNP reduziert in einer Konzentration von 1 mM mit Vorinkubation die Exflagellation auf 4,4 %. Die Hälfte aller Exflagellationszentren ist unter Anwendung des Inhibitors in einer Konzentration von 225,8 μM zu verzeichnen. Der Aspartatprotease-Inhibitor Pepstatin A zeigt keinen Effekt auf die Mikrogametozytenexflagellation (Rupp *et al.*, 2008).

Tabelle 3.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays unter Verwendung von Protease-Inhibitoren (Rupp *et al.*, 2008).

	Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren				
	TLCK	TPCK	PMSF	Antipain	Leupeptin
Inhibition mit/ohne Vorinkubation (VI)	Inhibition ohne VI	Inhibition ohne VI	Inhibition nur mit VI	auch mit VI keine Inhibition	auch mit VI keine Inhibition
IC ₅₀ [μM]	12,6 \pm 5,40	16,1 \pm 2,57	211,2 \pm 68,23	-	-
	Cysteinprotease-Inhibitoren				
	E-64	E-64d	bADA	RV112D	
Inhibition mit/ohne Vorinkubation (VI)	auch mit VI keine Inhibition	auch mit VI keine Inhibition	Inhibition nur mit VI	Inhibition nur mit VI	
IC ₅₀ [μM]	-	-	100,2 \pm 35,59	157,6 \pm 31,18	
	Metalloprotease-Inhibitoren		Aspartatprotease-Inhibitoren		
	1,10-Phenanthrolin	Phosphoramidon	EPNP	Pepstatin A	
Inhibition mit/ohne Vorinkubation (VI)	Inhibition ohne VI	auch mit VI keine Inhibition	Inhibition nur mit VI	auch mit VI keine Inhibition	
IC ₅₀ [μM]	33,2 \pm 6,31	-	225,8 \pm 20,50	-	

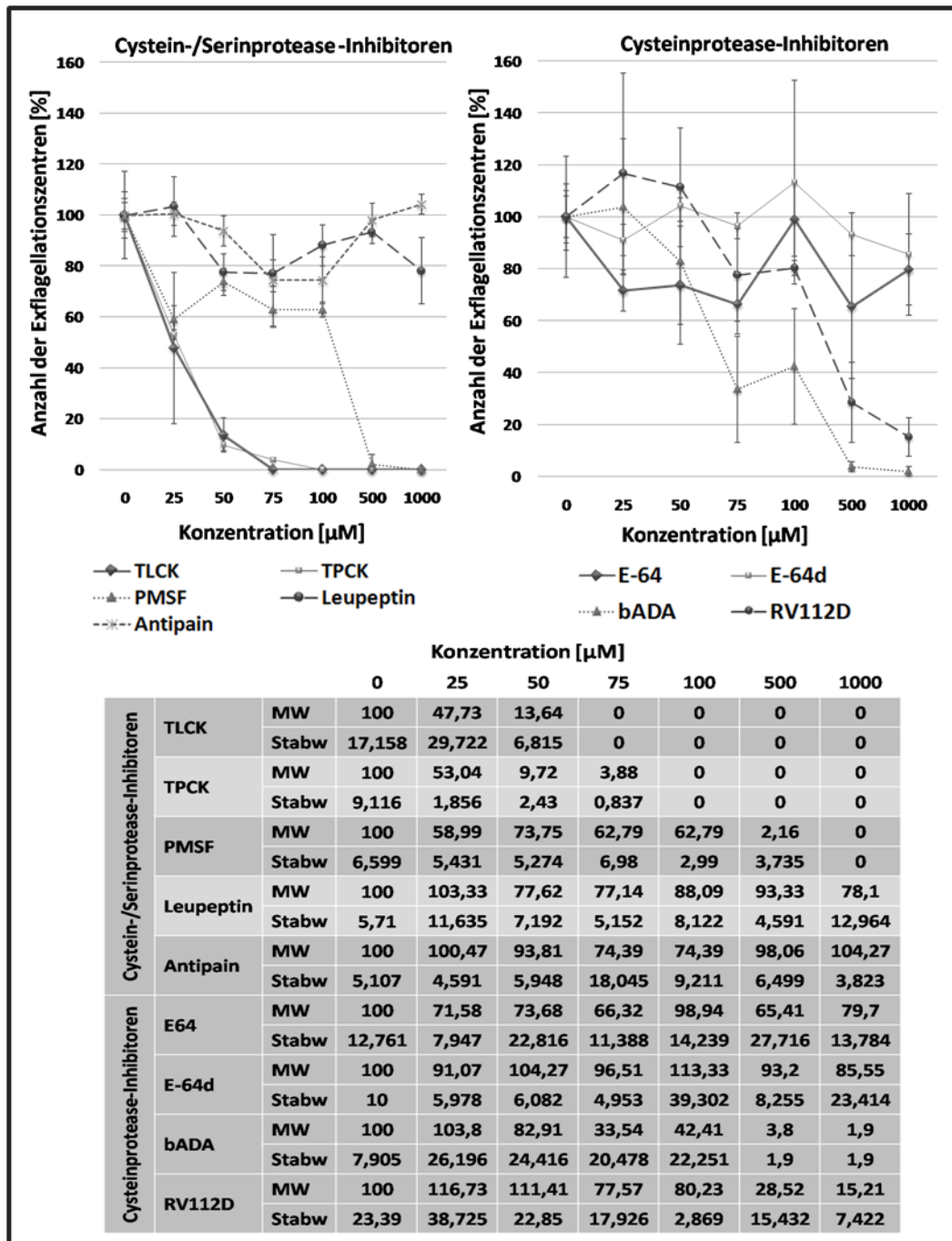


Abbildung 3.1A. Die Wirkung von Cystein-/Serinprotease-, und Cysteinprotease-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation. Reife Gametozytenkulturen wurden mit Protease-Inhibitoren in Konzentrationen von 25 μM bis 1 mM inkubiert, und die Exflagellationsfähigkeit in drei unabhängigen Experimenten mittels Exflagellationsinhibitionsassay analysiert. Die Ergebnisse wurden in Relation zu Inhibitor-unbehandelten Kontrollen gesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse sind angegeben. Sowohl die Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren TLCK, TPCK und PMSF hemmen die Exflagellation, als auch die Cysteinprotease-Inhibitoren bADA und RV112D (Rupp *et al.*, 2008). MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

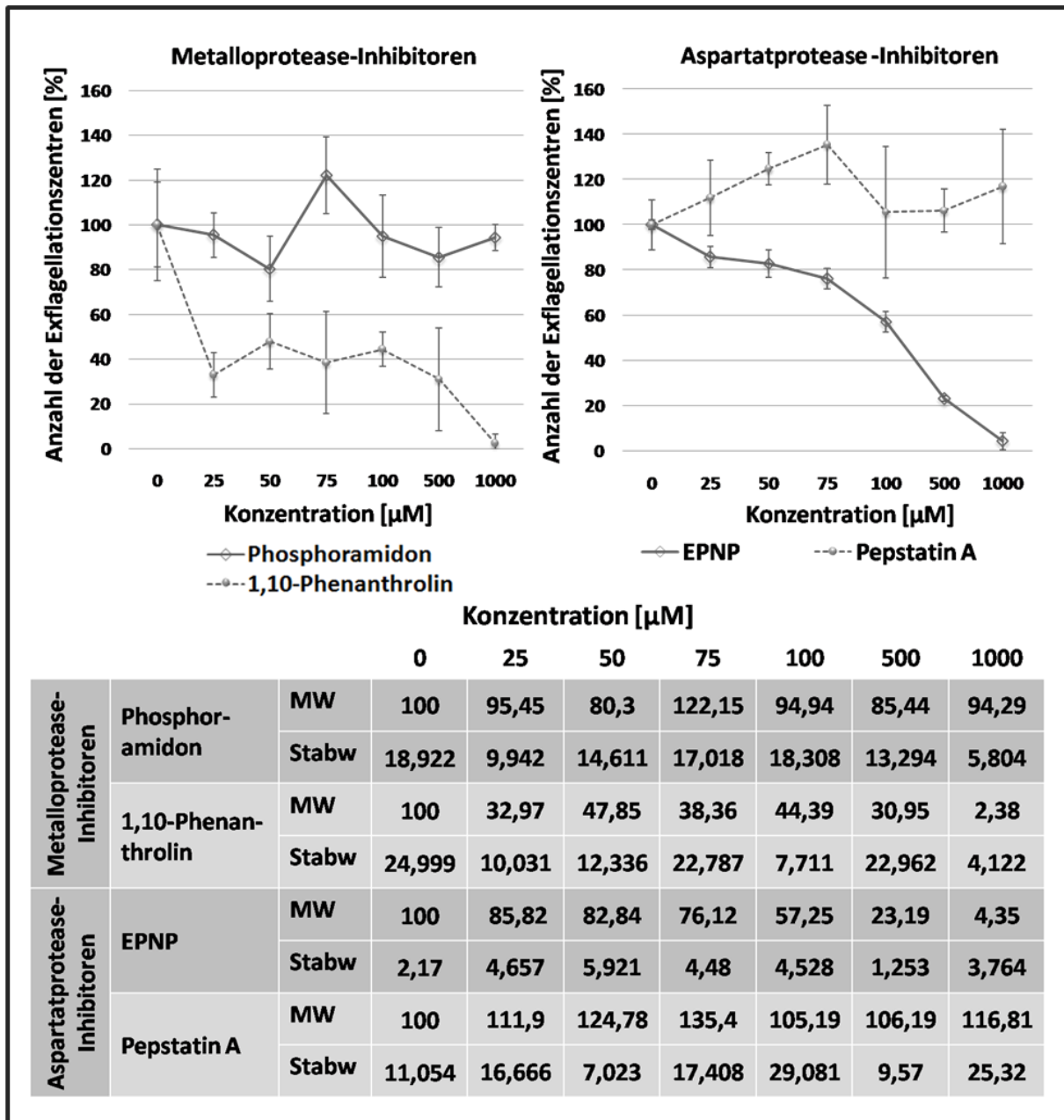


Abbildung 3.1B. Die Wirkung von Metalloprotease- und Aspartatprotease-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation. Reife Gametozytenkulturen wurden mit Protease-Inhibitoren in Konzentrationen von 25 μM bis 1 mM inkubiert, und die Exflagellationsfähigkeit in drei unabhängigen Experimenten mittels Exflagellationsinhibitionsassay analysiert. Die Ergebnisse wurden in Relation zu Inhibitor-unbehandelten Kontrollen gesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse sind angegeben. Sowohl der Metalloprotease-Inhibitor 1,10-Phenanthrolin, als auch der Aspartatprotease-Inhibitor EPNP hemmt die Exflagellation (Rupp *et al.*, 2008). MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

3.1.1.2 Lokalisation der Zielmoleküle des Protease-Inhibitors bADA im Lebenszyklus von *P. falciparum*

In Kapitel 3.1.1.1 ist beschrieben worden, dass der Cysteinproteasen-, und Falcipaine-hemmende Inhibitor bADA (*biotinylated dibenzyl aziridine-2,3-dicarboxylic acid*; Gelhaus *et al.*, 2004) die Mikrogametozytenexflagellation hemmt. Dieser Inhibitor ist Biotin-gekoppelt, welches hochaffin an Streptavidin bindet. Um herauszufinden, in welchen Stadien im Lebenszyklus von *P. falciparum* die inhibierten Proteasen aktiv und in welchen Zellkompartimenten die Zielproteasen lokalisiert sind, wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Asexuelle Parasitenkulturen und reife Gametozytenkulturen wurden mit 10 μM bADA unter normalen Zellkulturbedingungen für zehn Stunden inkubiert, wie beschrieben in Gelhaus *et al.*, 2005. Als Kontrolle dienten Kulturen, die mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels (DMSO) inkubiert wurden. Die Parasiten wurden anschließend auf Objektträger aufgebracht und für indirekte Immunfluoreszenzanalysen aufbereitet (siehe 2.2.1.14). Zur Immunlokalisation dienten als stadienspezifische Primärantikörper polyklonales Antiserum gegen *PMSP-1* (asexuelle Parasitenstadien), polyklonales Antiserum gegen *Pfs230* (exprimiert ab Stadium-II-Gametozyten und Makrogameten; Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1986; Quakyi *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1993; Williamson *et al.*, 1995), und ein monoklonaler anti- α -tubulin Antikörper (markiert Gametozyten, Makrogameten, aktivierte Makrogametozyten und Mikrogameten; siehe Abbildung 3.2). Zur Detektion der gebundenen Primärantikörper wurden Alexa-488-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Um bADA in den fixierten Proben zu markieren, wurde ein Cy3-Streptavidin-Konjugat eingesetzt.

Trophozoiten und Schizonten zeichnen sich durch eine homogene Verteilung des Inhibitors im gesamten Parasiten aus (Abbildung 3.2). In den Sexualstadien ist in Gametozyten von Stadium I-V und Makrogameten ebenfalls eine homogene Verteilung von bADA erkennbar. Mikrogameten hingegen zeigen keine Markierung des Inhibitors. In der Nahrungsvakuole der genannten Parasitenstadien scheint bADA allerdings nicht vorzuliegen. In den mit DMSO behandelten Kontrollkulturen wurde keine Cy3-Fluoreszenz beobachtet. Zu dieser Verdeutlichung ist exemplarisch ein Stadium-III-Gametozyt als Vertreter der Sexualstadien sowie mehrere Trophozoiten als Vertreter der asexuellen Parasitenstadien gezeigt. Da der Inhibitor nur an aktive Proteasen bindet (Gelhaus *et al.*, 2005), lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass in den markierten Parasitenstadien die Zielproteasen von bADA aktiv sind und offenbar homogen verteilt im Zytoplasma vorliegen.

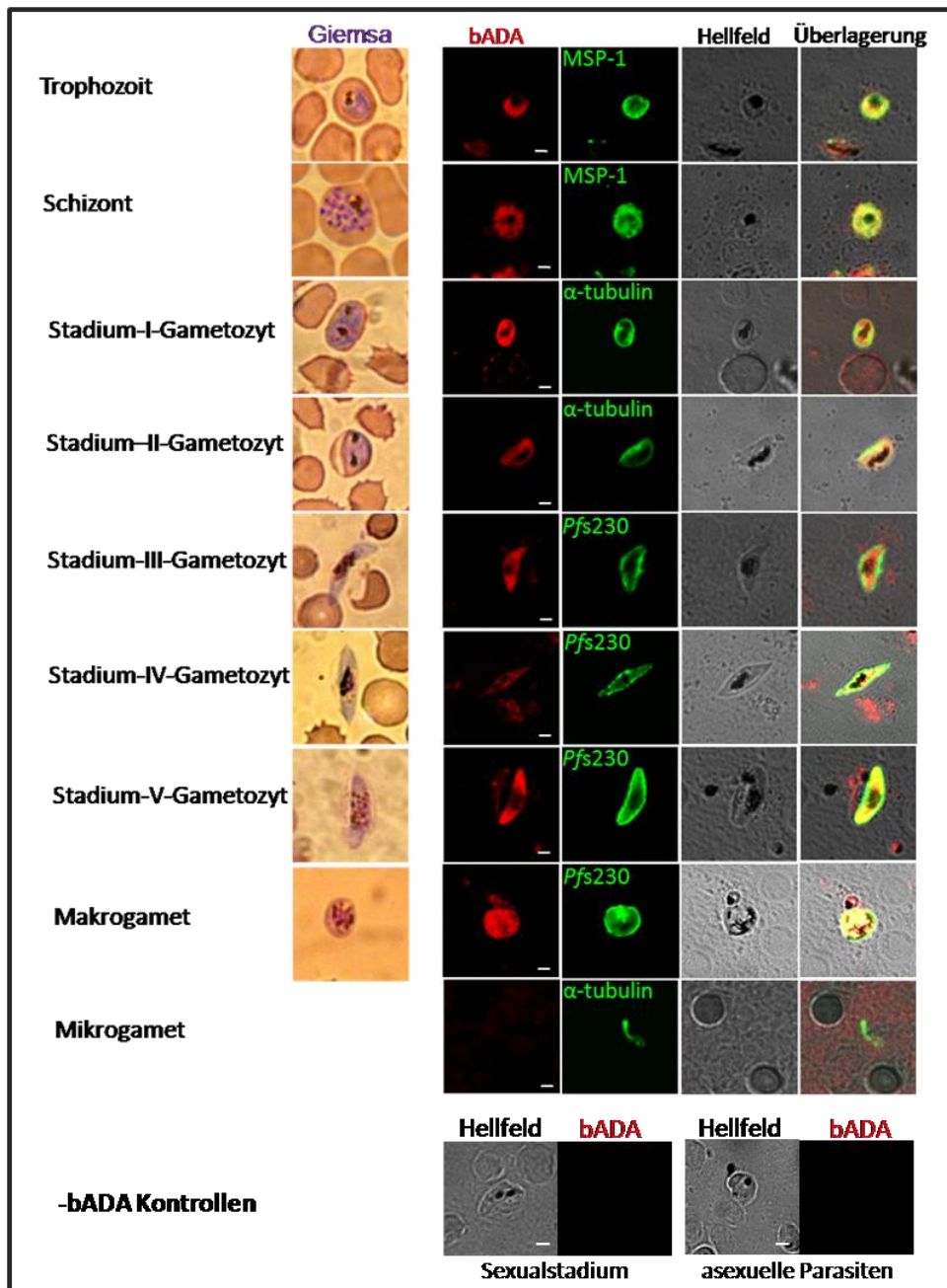


Abbildung 3.2 Immunlokalisation von bADA in damit behandelten *P. falciparum*-Kulturen. Parasitenkulturen wurden mit bADA inkubiert und Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Ein Cy3-gekoppeltes Streptavidin-Konjugat diente zur Markierung des Biotin-gekoppelten Inhibitors bADA (rot). Für stadienspezifische Kontrollmarkierungen wurden Antiseren gegen *PMSP-1*, *Pfs230*, und ein anti- α -tubulin Antikörper in Verbindung mit Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpern (grün) eingesetzt. Der Inhibitor bADA bindet an Zielproteasen, die in den asexuellen Parasitenstadien (Trophozoiten, Schizonten) und den Sexualstadien (Stadium-I-V-Gametozyten, Makrogameten) mit Ausnahme der Mikrogameten aktiv sind. Die homogene Verteilung der Markierung deutet auf eine Lokalisation der Zielproteasen im Zytoplasma der Zellen hin. Zur Verdeutlichung der Morphologie der jeweiligen Parasitenstadien dienen entsprechende Giemsa-gefärbte Blutausstriche. In Kontrollkulturen, die nur mit dem bADA-Lösungsmittel DMSO inkubiert worden waren, wurde erwartungsgemäß keine Cy3-Fluoreszenz detektiert (-bADA Kontrollen). Größenangabe, 2 μ m.

3.1.2 Die Charakterisierung ausgewählter Proteasen

Die funktionelle Charakterisierung von Proteasen, die in der Sexualentwicklung von *P. falciparum* involviert sein können, stand im Fokus dieser Arbeit und ist von besonderem Interesse für die Entwicklung von transmissionsblockierenden Strategien. 92 putative Proteasen konnten dem Genom von *P. falciparum* zugeordnet werden (Wu *et al.*, 2003). Sechs verschiedene Proteasen wurden zur näheren Charakterisierung ausgewählt: DPAP2 (PFL2290w), Calpain (MAL13P1.310), Metacaspase 2 (PF14_0363), GPI8 (PF11_0298), Plasmepsin 6 (PFC0495w; Coombs *et al.*, 2001) und *PfSub3* (PFE0355c; Withers-Martinez *et al.*, 2004). Ein entscheidendes Kriterium bei der Auswahl der genannten Proteasen war unter anderem deren Transkription und/oder Translation in den Sexualstadien von *P. falciparum*. In Abbildung 1.7 ist eine Schemazeichnung der ausgewählten Proteasen aufgeführt.

3.1.2.1. Transkriptionsstudien

Um die Transkription der ausgewählten Proteasengene in den Sexualstadien vergleichend mit der Transkription in asexuellen Parasitenstadien zu untersuchen, wurden diagnostische RT-PCR Analysen angewendet. Es wurde RNA aus asexuellen Parasitenkulturen, Gametozyten, Gameten und Zygoten isoliert und in der Transkriptionsanalyse mit 35 Zyklen eingesetzt (siehe 2.2.2.10 und 2.2.2.2). Für die RNA-Isolation der asexuellen Parasiten wurde die Zelllinie F12 verwendet, die keine Gametozyten ausbildet (Alano *et al.*, 1995). Dies diente dazu, eine Kontamination der RNA aus asexuellen Parasiten mit RNA aus Sexualstadien zu vermeiden. Als Positivkontrolle wurden jeweils Oligonukleotidpaare stadienspezifischer Gene in Verbindung mit cDNA eingesetzt. Für die asexuellen Proben wurden Oligonukleotidpaare für *PfAMA-1* (Peterson *et al.*, 1989; Narum & Thomas, 1994; Hodder *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1996) oder Plasmepsin 1 (Bozdech *et al.*, 2003) verwendet, für Gametozyten *PfCCp1* (Pradel *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2006; Scholz *et al.*, 2008), und für Gameten und Zygoten *Pfs25* (Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990). Als Negativkontrolle dienten cDNA-Proben, die ohne Zugabe von Reverser Transkriptase (RT) hergestellt wurden und somit keine cDNA enthalten sollten (-RT-Proben). Dies diente der Verifizierung, dass die RNA nicht mit genomischer DNA verunreinigt war. Die Proteasen DPAP2, Calpain, Metacaspase 2 und *PfSub3* werden in allen untersuchten Sexualstadien transkribiert. Für die Protease GPI8 konnte mRNA in den Gametozyten und den Zygoten nachgewiesen werden. Die Protease Plasmepsin 6 wird in den Gametozyten und Gameten transkribiert. Für alle untersuchten Proteasen wurde zudem mRNA in den asexuellen Parasitenstadien detektiert (Abbildung 3.3).

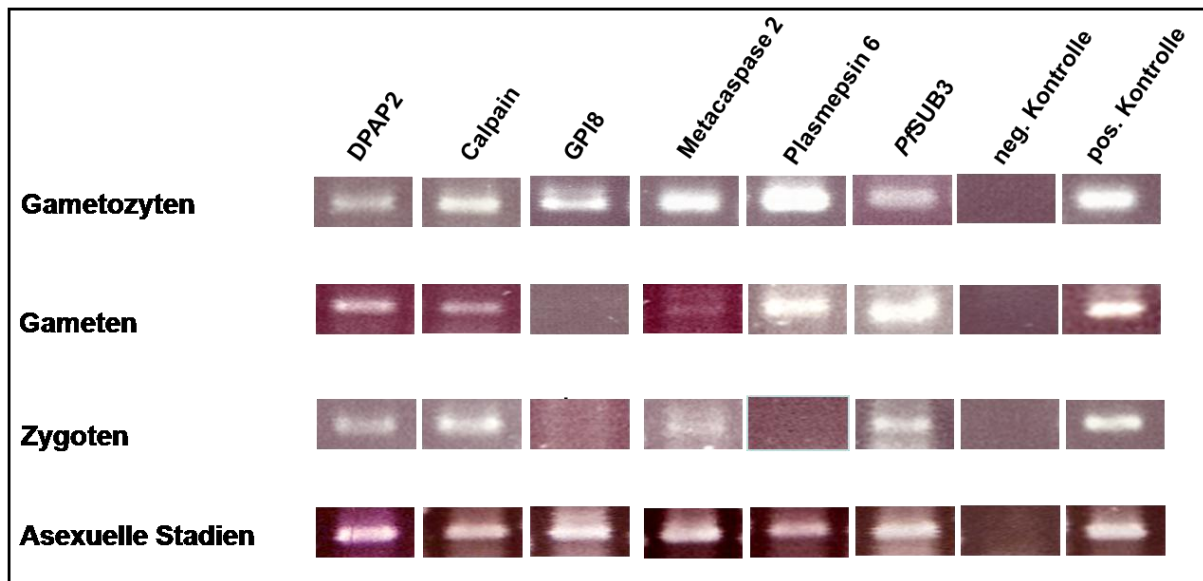


Abbildung 3.3. Transkriptionsanalysen ausgewählter Proteasen in asexuellen Parasitenkulturen und Sexualstadien. Isolierte RNA aus asexuellen Parasiten, Gametozyten, Gameten und Zygoten wurde in diagnostischer RT-PCR mit 35 Zyklen eingesetzt. Die Proteasen DPAP2, Calpain, Metacaspase 2 und *PfSub3* werden in allen untersuchten Parasitenstadien transkribiert. Für die Protease GPI8 konnte in allen Stadien mit Ausnahme der Gameten mRNA nachgewiesen werden. Plasmepsin 6 wird in allen Stadien außer den Zygoten transkribiert. Positivkontrolle und Negativkontrolle: Oligonukleotidpaare stadienspezifischer Gene (asexuelle Stadien, *PfAMA-1* und Plasmepsin 1; Gametozyten, *PfCCp1*; Gameten, *Pfs25*; Zygoten, *Pfs25*) mit cDNA bzw. -RT-cDNA. *, Bande im Original deutlich erkennbar.

3.1.2.2 Die Herstellung von Gen-*knockout*-Parasiten

Um mehr über die Funktion der ausgewählten Proteasen zu erfahren, wurde die Strategie des Gen-*knockouts* (KO) über homologe *single-crossover*-Rekombination gewählt (Wu *et al.*, 1996). Für die Proteasen Calpain, GPI8, Metacaspase 2, Plasmepsin 6 und *PfSub3* wurden *knockout*-Konstrukte, basierend auf dem Vektor pDT_*Tg23*, hergestellt (siehe 2.2.1.7). Die korrekte Basenabfolge der KO-Konstrukte wurde durch entsprechende Sequenzierreaktionen überprüft (siehe 2.2.2.9; dem Anhang auf CD sind die Ergebnisse der Sequenzanalyse der fünf KO-Konstrukte beigefügt). Das Konstrukt für Calpain wurde in Zusammenarbeit mit Frau cand. biol. R. Bosse hergestellt. Das Konstrukt für *PfSub3* wurde während eines Forschungsaufenthaltes im Labor von Prof. Dr. K.C. Williamson, Chicago, hergestellt. Asexuelle Parasitenstadien wurden mit den Konstrukten elektroporiert. Die Parasiten wurden anschließend unter Pyrimethaminselektion kultiviert. Dabei sterben sukzessive Wildtypparasiten ab, in denen das KO-Konstrukt weder episomal noch im Genlocus integriert vorliegt. Bei den *PfSub3*-KO-Parasitenkulturen wurde einmalig nach Elektroporation für vier Wochen die Pyrimethaminselektion ausgesetzt. Dies sollte zu einem Verlust der episomal vorliegenden *knockout*-Konstrukte in den entsprechenden Parasiten

Ergebnisse

führen. Die KO-Konstrukte für die Proteasen Metacaspase 2 und Plasmepsin 6 wurden zusätzlich bzw. ausschließlich im Labor von Dr. Jude Przyborski, Marburg, elektroporiert und kultiviert. Die von Dr. J. Przyborski transfizierten Parasiten wurden drei Wochen lang nach Elektroporation ohne Pyrimethaminselektion und danach für drei Wochen mit Pyrimethaminselektion kultiviert. Es schlossen sich zwei weitere Zyklen der Kultivierung ohne Selektionsdruck bzw. mit Selektionsdruck an. Es wurde genomische DNA aus den elektroporierten Parasitenkulturen isoliert (siehe 2.2.2.11) und in PCR-Analysen mit ausgesuchten Oligonukleotidpaar-Kombinationen eingesetzt (siehe Abbildung 2.3 und 2.2.2.2), um die Genloci in Hinblick auf Vektor-Integration zu untersuchen. In Tabelle 3.2 sind die erwarteten PCR-Bandengrößen aufgelistet.

In PCR-Analysen mit gDNA aus Calpain-KO-Parasitenkulturen konnten nach 24 Wochen Kultivierung unter Pyrimethaminselektion eine Bande für den Wildtypgenlocus mit ca. 975 Basenpaaren (bp) ohne Rekombination sowie eine Bande für das episomal vorliegende KO-Konstrukt von ca. 570 bp aufgewiesen werden (Abbildung 3.4). Entsprechende PCR-Analysen der GPI8-KO-Parasitenkulturen wiesen nach 12 Wochen Kultivierung unter Pyrimethaminselektion sowohl eine Bande für den wildtypischen Locus von ca. 726 bp ohne Rekombination als auch eine Bande für das episomale Konstrukt von ca. 632 bp auf (Abbildung 3.4).

Tabelle 3.2. Erwartete Bandengrößen der PCR-Produkte bei Genlocus-Analysen der KO-Parasiten. Zwei verschiedene Bandengrößen für das Metacaspase 2-KO-Konstrukt basieren auf zwei unterschiedlich eingesetzten Oligonukleotiden in den entsprechenden PCR-Analysen. Angaben in Basenpaaren (bp).

	Calpain	GPI8	Plasmepsin 6	Metacaspase 2	PfSub3
Wildtyp	975	726	713	853	781
KO-Konstrukt	570	632	610	519/547	659
Rekombinierter Genlocus 5'-Terminus	nicht getestet	nicht getestet	758	654	872
Rekombinierter Genlocus 3'-Terminus	606	750	726	874	759

Die Plasmepsin 6-KO-Kulturen wurden 18 Wochen alternierend mit bzw. ohne Pyrimethaminselektion kultiviert und danach gDNA isoliert. PCR-Analysen detektierten jeweils eine Bande für den Wildtyplocus ohne Rekombination und das KO-Konstrukt mit ca. 713 bzw. 610 bp (Abbildung 3.4). Zusätzliche, kleinere unspezifische Banden traten dabei in den PCR-Analysen auf.

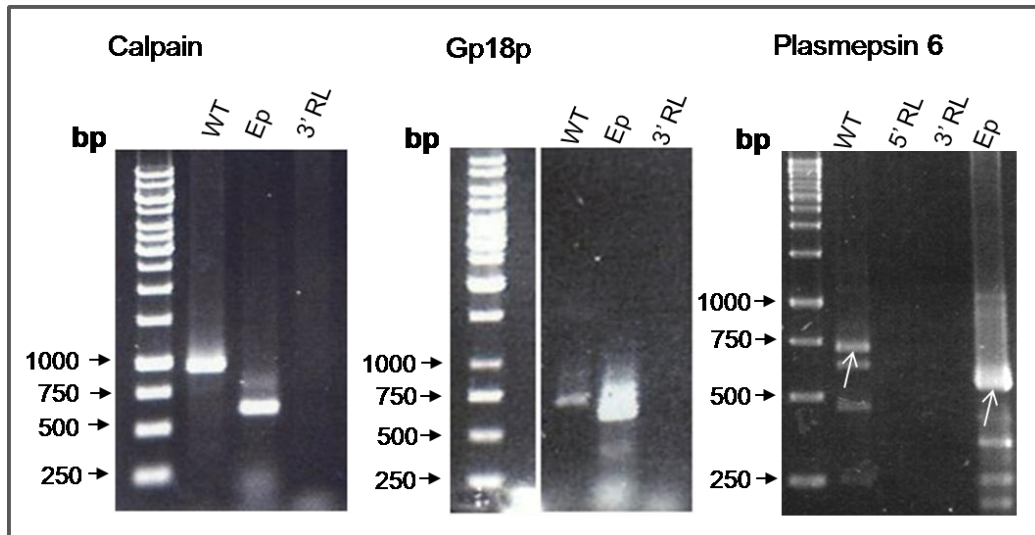


Abbildung 3.4. Genloci der KO-Parasitenkulturen für Calpain, GPI8 und Plasmeysin 6 nach Pyrimethaminselektion. Isolierte gDNA-Proben aus transfizierten Parasiten wiesen bei PCR-Analysen spezifische Bandengrößen für den Wildtyplocus ohne Rekombination und das episomal vorliegende KO-Konstrukt auf (Banden durch Pfeile angezeigt). Zusätzliche unspezifische Banden traten bei Plasmeysin 6 bei Oligonukleotidpaaren für den Wildtyplocus und das episomale Konstrukt auf. WT, Wildtyp; Ep, episomales KO-Konstrukt; 3'RL, rekombinierter Genlocus am 3'-Terminus getestet; 5'RL, rekombinierter Genlocus am 5'-Terminus getestet; bp; Basenpaare.

Aus Metacaspase 2-KO-Parasitenkulturen wurde nach 12 Wochen Kultivierung unter Pyrimethaminselektion gDNA isoliert. PCR-Analysen zeigten eine Bande für den rekombinierten Genlocus am 3'-Terminus mit ca. 874 bp auf (Abbildung 3.5A). Es konnte keine Bande für den Wildtyplocus, aber eine Bande für das episomale Konstrukt von ca. 519 bp festgestellt werden. Diese Mischkultur konnte für weitergehende Experimente allerdings nicht verwendet werden, da die Parasiten kurz nach der PCR-Analyse abgestorben waren. Bei einer wiederholten Elektroporation des Konstruktes wurde nach 20 Wochen Kultivierung unter Pyrimethaminselektion gDNA isoliert. PCR-Analysen detektierten eine Bande für den Wildtyplocus ohne Rekombination mit ca. 853 bp, und eine schwache Bande für das episomale KO-Konstrukt mit ca. 519 bp (Abbildung 3.5B). Metacaspase 2-KO-Parasitenkulturen wurden 18 Wochen im Labor von Dr. J. Przyborski kultiviert und anschließend gDNA isoliert. PCR-Analysen zeigten eine Bande für den Wildtyplocus ohne Rekombination mit ca. 853 bp und das episomale Konstrukt mit ca. 547 bp (Abbildung 3.5C).

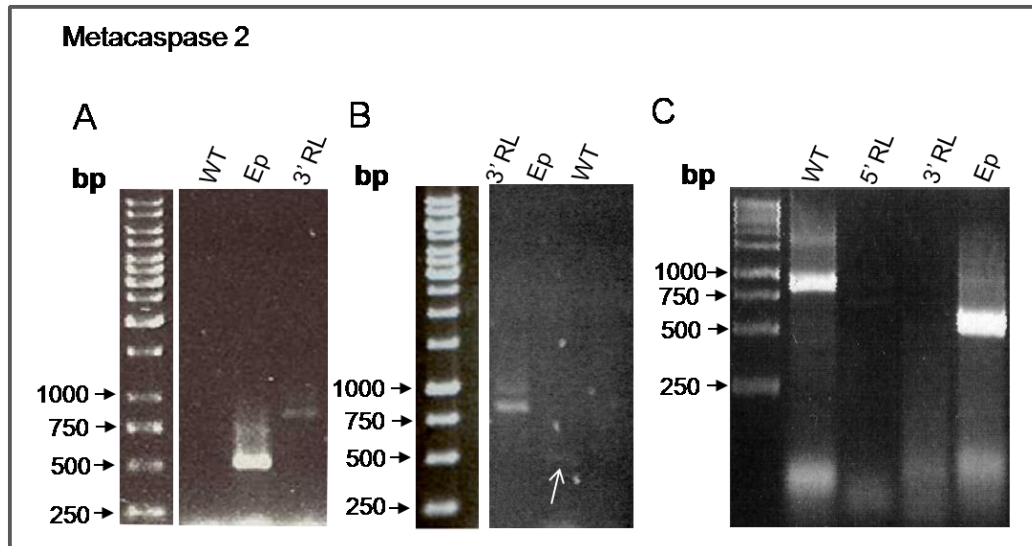


Abbildung 3.5. Genlocus der Metacaspase 2-KO-Parasitenkulturen nach Pyrimethaminselektion. Aus transfizierten Parasitenkulturen drei unabhängiger Elektroporationen wurde gDNA isoliert und deren Genloci mittels PCR-Analyse untersucht. Es konnten spezifische Bandengrößen für den Wildtyplocus mit Rekombination am 3'-Terminus und das episomal vorliegende KO-Konstrukt nachgewiesen werden (A) bzw. Wildtyplocus ohne Rekombination und das episomale KO-Konstrukt (B,C). WT, Wildtyp; Ep, episomales KO-Konstrukt; 3'RL, rekombinierter Genlocus am 3'-Terminus getestet; 5'RL, rekombinierter Genlocus am 5'-Terminus getestet; bp, Basenpaare; Pfeil, angezeigte Bande im Original deutlich erkennbar.

Die *PfSub3*-KO-Parasitenkulturen wurden erstmalig während eines Forschungsaufenthaltes im Labor von Prof. Dr. K.C. Williamson, Chicago, in drei unabhängigen Ansätzen elektroporiert. Nach drei Wochen Kultivierung der Parasiten unter Pyrimethaminselektion wurde gDNA isoliert. PCR-Analysen zeigten Banden für den rekombinierten Genlocus am 5' Terminus von ca. 872 bp (Abbildung 3.6A). In einer wiederholten Elektroporation im Labor von Dr. G. Pradel wurde nach acht Wochen Kultivierung der KO-Parasitenkulturen unter Pyrimethaminselektion gDNA isoliert. Anschließend PCR-Analysen detektierten spezifische Banden für den rekombinierten Genlocus am 3'- sowie 5'-Terminus von ca. 759 bzw. 872 bp. Zusätzlich zeigten die Analysen Banden sowohl für den Wildtyplocus von ca. 781 bp als auch für das episomale KO-Konstrukt von ca. 659 bp (Abbildung 3.6B). Die Banden der 5'- und 3'-Termini des rekombinierten Genlocus aus der PCR-Analyse (Abbildung 3.6B, Pfeil) wurden sequenziert, um zu verifizieren, dass sie spezifische Banden für den *PfSub3*-Genlocus darstellen (die Ergebnisse der Sequenzierreaktionen sind dem Anhang auf CD beigefügt). Um aus dieser Mischkultur einzelne Parasitenklone auszuwählen, die nur den rekombinierten Genlocus aufzeigten, wurde die Technik des *limited dilution cloning* angewandt (siehe 2.2.1.8). Es wurden fünf einzelne Klone ausgewählt, einzeln kultiviert und anschließend gDNA isoliert. Anschließend PCR-Analysen detektierten spezifische Banden

Ergebnisse

sowohl für den Wildtyplocus ohne Rekombination von ca. 781 bp als auch für das episodale KO-Konstrukt von ca. 659 bp. Abbildung 3.6C zeigt exemplarisch das Ergebnis von zwei der fünf analysierten Parasitenklone. Abbildung 3.6D zeigt exemplarisch das Ergebnis von drei dieser fünf analysierten Parasitenklone, die zusätzlich eine 2,5-3 Kilobasenpaare große Bande in den Proben für den rekombinierten Genlocus am 5' Terminus aufzeigten. Die Ausklonierung der Mischkultur erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Biol. R. Frank.

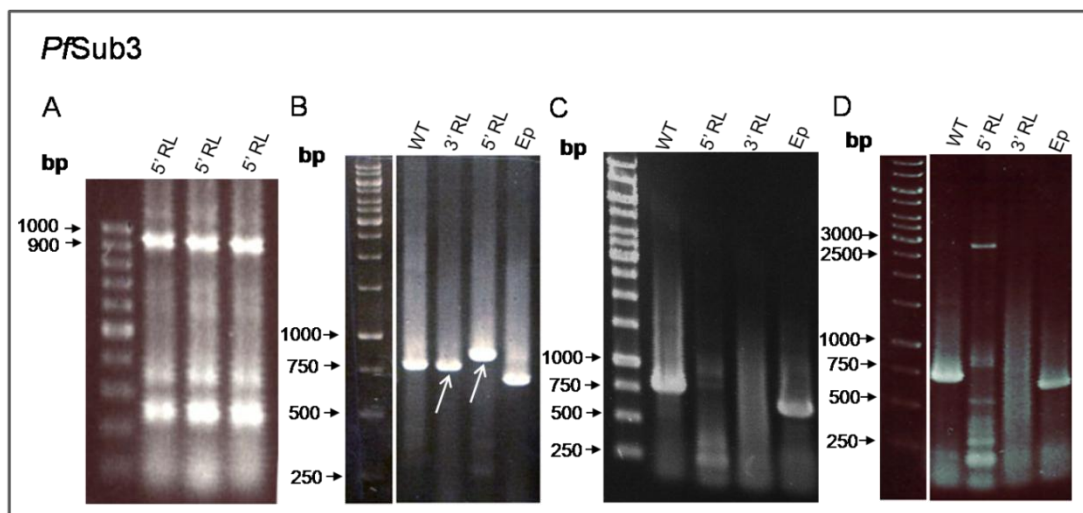


Abbildung 3.6. Genlocianalysen der *PfSub3*-KO-Parasitenkulturen nach Pyrimethaminselektion. Aus transfizierten Parasitenkulturen unabhängiger Elektroporationen wurde gDNA isoliert und deren Genloci mittels PCR-Analyse untersucht. Es konnten spezifische Bandengrößen für den Wildtyplocus mit Rekombination am 5'- bzw. 3'-Terminus detektiert werden (**A,B**), sowie für das episodale vorliegende KO-Konstrukt und den Wildtyplocus ohne Rekombination (**B**). Sequenzierungen der Banden des rekombinierten Genlocus am 5'- und 3'-Terminus verifizierten diese als spezifische Banden für den rekombinierten Locus (Pfeil). Einzel kultivierte Parasitenklone zeigten nur Banden für den Wildtyplocus ohne Rekombination und das episodale KO-Konstrukt auf. Es wurden zusätzliche unspezifische Schmierbanden detektiert, die bei einer Zyklusanzahl von 40 zu vernachlässigen waren (**C**). Bei einigen der untersuchten Einzelklone trat zusätzlich eine 2,5-3 kb große Bande in den Proben für den 5' Terminus des rekombinierten Genlocus auf (**D**). WT, Wildtyp; Ep, episodales KO-Konstrukt; 3'RL, rekombinierter Genlocus am 3'-Terminus getestet; 5'RL, rekombinierter Genlocus am 5'-Terminus getestet; bp, Basenpaare; Pfeil, sequenzierte Banden.

3.1.2.3 Die Herstellung rekombinanter Proteine und die Gewinnung von Immunsereum

Für die nähere Charakterisierung von *PfSub3* wurde rekombinantes Protein hergestellt, um anschließend polyklonales Mäuseserum für weitere Experimente zu erhalten. Aus dem *PfSub3*-Gen wurde ein 351 bp langes Fragment, welches 117 Aminosäuren entspricht, aus der katalytischen Domäne ausgewählt. Die Genregion wurde mit dem Oligonukleotidpaar *PfSub3for6* und *PfSub3rev3* mittels PCR amplifiziert (siehe Abbildung 3.7, Tabelle 2.4 und

Ergebnisse

Kapitel 2.2.2.2). Das PCR-Produkt wurde in 3'-Orientierung des Leserasters an das *malE*-Gen zwischen die Schnittstellen BamHI und PstI in den Expressionsvektor pIH902 kloniert (siehe 2.2.3.1). Das resultierende Protein besteht aus dem N-terminalen Maltose-Binde-Protein (MBP) mit dem das rekombinante *PfSub3*-Proteinfragment fusioniert ist. Die Gesamtgröße des Fusionsproteins beträgt 53 kDa (40+13 kDa).

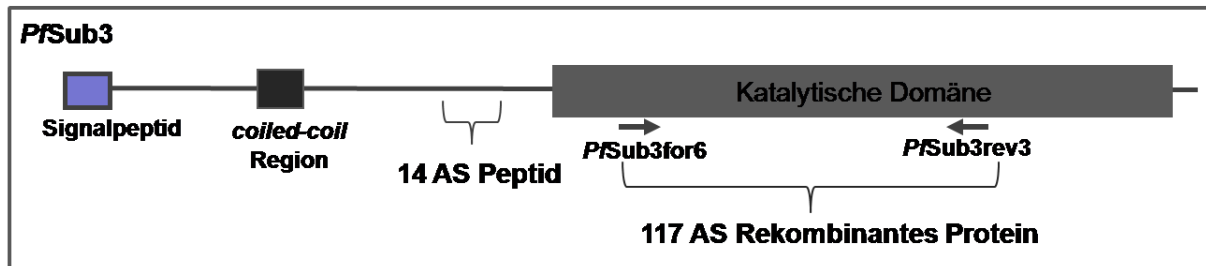


Abbildung 3.7. Schematische Darstellung des *PfSub3* Proteins. Das Oligonukleotidpaar *PfSub3for6* und *PfSub3rev3* umfaßt ein Genfragment, welches für 117 Aminosäuren in der katalytischen Domäne kodiert, und zur Herstellung von rekombinantem Protein benutzt wurde. Ein 14 Aminosäuren langes Fragment vor der katalytischen Domäne wurde zur Synthese eines Peptidantikörpers ausgewählt (Biogenes, Berlin). Das *PfSub3* Protein beinhaltet ein Signalpeptid und eine *coiled coil* Domäne.

Die Expression des ausgesuchten Proteinfragmentes wurde mittels Miniexpression (siehe 2.2.3.1) in *E. coli* BL21-(DE3)-RIL-Zellen und anschließender SDS-Page und Gelfärbung untersucht (siehe siehe 2.2.3.4 und 2.2.3.5). Es wurden drei Bakterienklone ausgewählt, die mit dem hergestellten Expressionskonstruktes transformiert worden waren. Alle drei ausgesuchten Bakterienklone wiesen in Höhe von ca. 53 kDa eine zusätzliche Bande im Gegensatz zu nicht-induzierten Kulturen auf (Abbildung 3.8A zeigt exemplarisch das Ergebnis für einen dieser Klone). Die nachfolgende Sequenzierungsreaktion (siehe 2.2.2.9) der gDNA für einen dieser Klone (benannt als #6-4) bestätigte die korrekte Basenabfolge des *PfSub3*-Genabschnittes im Vektor pIH902. Die Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen des rekombinanten Expressionskonstrukts sind dem Anhang auf CD beigefügt. Das Fusionsprotein MBP-Sub3, sowie das MBP-Protein ohne den rekombinanten *PfSub3*-Teil wurden anschließend in *E. coli* BL21-(DE3)-RIL-Zellen überexprimiert und chromatographisch aufgereinigt (siehe 2.2.3.1 und 2.2.3.2). Dabei wurden Amylose-beladene Säulen verwendet, an die das MBP-Protein bindet. Abschließend wurden die Proteine mit Maltose-enthaltenden Puffern eluiert, und in 16 Einzelfractionen gesammelt. Die ersten fünf (MBP-Sub3) bzw. drei (MBP-Protein) Fractionen wurden vereinigt, da der Hauptteil der rekombinanten Proteine in diesen Fractionen eluiert wurde. Die Proteinkonzentration der vereinten Proteinproben wurde mittels einer Verdünnungsreihe und anschließender SDS-Page-Analyse und Gelfärbung in einer groben Näherung bestimmt (siehe Abbildung 3.8B,C und Kapitel 2.2.3.4 und 2.2.3.5).

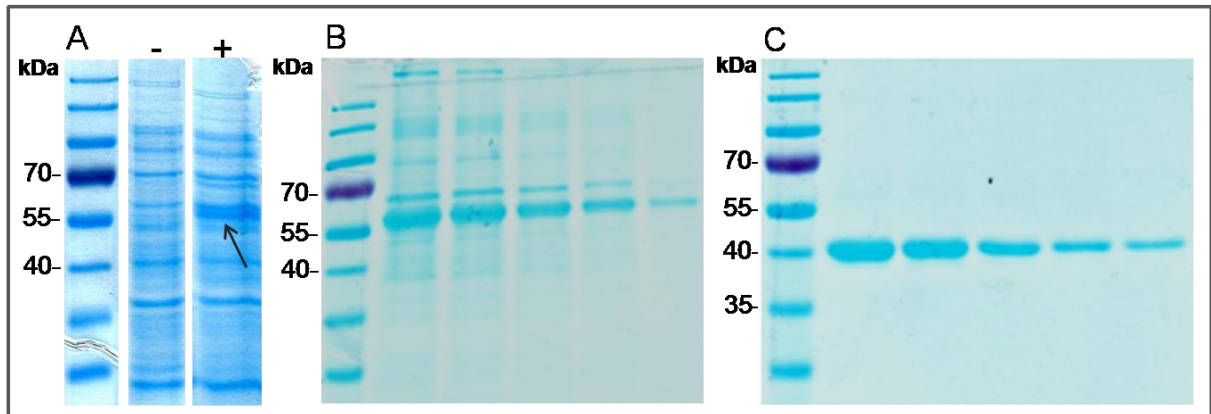


Abbildung 3.8. Expression und Aufreinigung des rekombinanten MBP-Sub3 und MBP-Proteins. **A.** Miniexpression in *E. coli* mit anschließender SDS-Page-Analyse zeigt eine zusätzliche Proteinbande in IPTG-induzierten Bakterienkulturen in Höhe von ca. 53 kDa. **B.** Verdünnungsreihe der ersten fünf eluierten und vereinigten Proteinfractionen nach chromatographischer Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins zeigt dessen Anreicherung auf einer Höhe von etwas über 55 kDa. **C.** Verdünnungsreihe der ersten drei eluierten und vereinigten Proteinfractionen nach chromatographischer Aufreinigung des Maltose-Binde-Proteins zeigt dessen Anreicherung auf Höhe von ca. 40 kDa. -, nicht IPTG-induzierte Bakterienkultur; +, induzierte Bakterienkultur; kDa, Kilodalton; Pfeil, Proteinbande des Fusionsproteins.

Das Fusionsprotein zeigt in der SDS-Page Analyse eine Größe etwas abweichend von dem errechneten Gewicht (53kDa) zwischen 55 und 70 kDa. Zusätzlich treten einige wenige unspezifische Proteinbanden auf (Abbildung 3.8B) Das MBP-Protein alleine zeigt nach chromatographischer Aufreinigung eine spezifische Proteinbande in Höhe von ca. 40 kDa (Abbildung 3.8C). Zur Herstellung von Antiserum wurden die aufgereinigten Proteine in einem PBS/Freund's-incomplete-Adjuvans Gemisch NMRI-Mäusen subdermal injiziert (siehe 2.2.3.6). Eine weitere Immunisierung erfolgte vier Wochen später und nach weiteren zehn Tagen die Gewinnung des Antiserums durch Herzmuskel-Punktur.

Zusätzlich wurde eine andere Strategie gewählt, um polyklonales Immuneserum gegen PfSub3 zu gewinnen. Von der Firma Biogenes, Berlin, wurde ein 14 Aminosäuren umfassendes Epitop (Aminosäuresequenz TSPYTLKLRDRNKY) ausgewählt und ein Peptidantikörper gegen dieses Epitop in Mäusen hergestellt. Die Lage des ausgewählten Epitops ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Es wurden zwei Mäuse mit dem Peptid immunisiert und die Antiseren einzeln getestet (α -Sub3-Peptidantikörper 1 und α -Sub3-Peptidantikörper 2).

3.1.2.4 Proteinexpressionsanalysen und Lokalisationsstudien von *PfSub3*

Die gewonnenen Immunsereen gegen *PfSub3* wurden für Proteinexpressionsstudien im Lebenszyklus von *P. falciparum* verwendet. Zunächst wurden die Immunsereen gegen die mittels SDS-Page aufgetrennten (siehe 2.2.3.4), rekombinanten Proteine MBP-Sub3 und MBP in Western-Blot-Studien getestet (siehe 2.2.3.3 und 2.2.3.7). Die Analyse mit dem α -MBP Serum zeigte das MBP-Protein auf einer Höhe von ca. 40 kDa. Dasselbe Serum detektierte MBP-Sub3 auf einer Höhe von ca. 53 kDa. Bei Verwendung des α -MBP-Sub3 Serums wurde das MBP-Sub3 Protein ebenfalls auf einer Höhe von ca. 53 kDa detektiert. Als Kontrolle dienen aufgereinigte nicht-aktivierte Gametozytenlysate, in denen *PfCCp1* unter Verwendung von entsprechendem Antiserum auf einer Höhe von ca. 185 kDa detektiert wurde (Abbildung 3.9A). Um die spezifische Erkennung der Immunsereen gegen das native *PfSub3* Protein zu untersuchen, wurden aufgereinigte Zelllysate unterschiedlicher Parasitenstadien von Wildtyp(WT)-Plasmodien mittels SDS-Page aufgetrennt (siehe 2.2.3.4). Die theoretische errechnete Größe von *PfSub3* ohne proteolytische Prozessierungen beträgt 84 kDa. Untersucht wurden Zelllysate asexueller Parasitenstadien, nicht-aktivierte aufgereinigte Gametozyten und aktivierte aufgereinigte Gametozyten (siehe 2.2.3.3). Für die Proben der asexuellen Parasitenstadien wurde die Zelllinie F12 verwendet, welche keine Gametozyten ausbildet (Alano *et al.*, 1995). Die Immunsereen α -MBP, α -MBP-Sub3, sowie α -Sub3-Peptidantikörper 1 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 wurden anschließend in Western-Blot-Studien getestet (siehe 2.2.3.7). Als stadienspezifische Kontrollen der verwendeten Parasiten dienen Antiseren gegen *PfCCp1* oder *PfCCp2* für nicht-aktivierte Gametozyten bzw. *Pf39* für asexuelle Parasitenstadien. *PfCCp1* und *PfCCp2* werden in Gametozyten und Gameten exprimiert (Pradel *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2008), während das ER-assoziierte Protein *Pf39* in asexuellen Parasitenstadien sowie Gametozyten exprimiert wird (Templeton *et al.*, 1997). Der α -Sub3-Peptidantikörper 1 zeigt auf einer Höhe zwischen 130 und 250 kDa eine Bande in den aktivierten und nicht-aktivierten Gametozyten (Abbildung 3.9B). In den Proben asexueller Parasitenstadien konnte dagegen keine Bande detektiert werden. Der α -Sub3-Peptidantikörper 2 zeigt sowohl in aktivierten und nicht-aktivierten Gametozyten als auch in asexuellen Parasitenstadien eine Bande auf einer Höhe zwischen 100 und 130 kDa. Die entsprechende Positivkontrolle unter Verwendung von nicht-aktiviertem Gametozytenlysat in Kombination mit *PfCCp2*-Antiserum detektierte *PfCCp2* auf der erwarteten Höhe von ca. 185 kDa. Die zweite Proteinbande von *PfCCp2* wurde auf einer Höhe von etwas größer als 70 kDa detektiert.

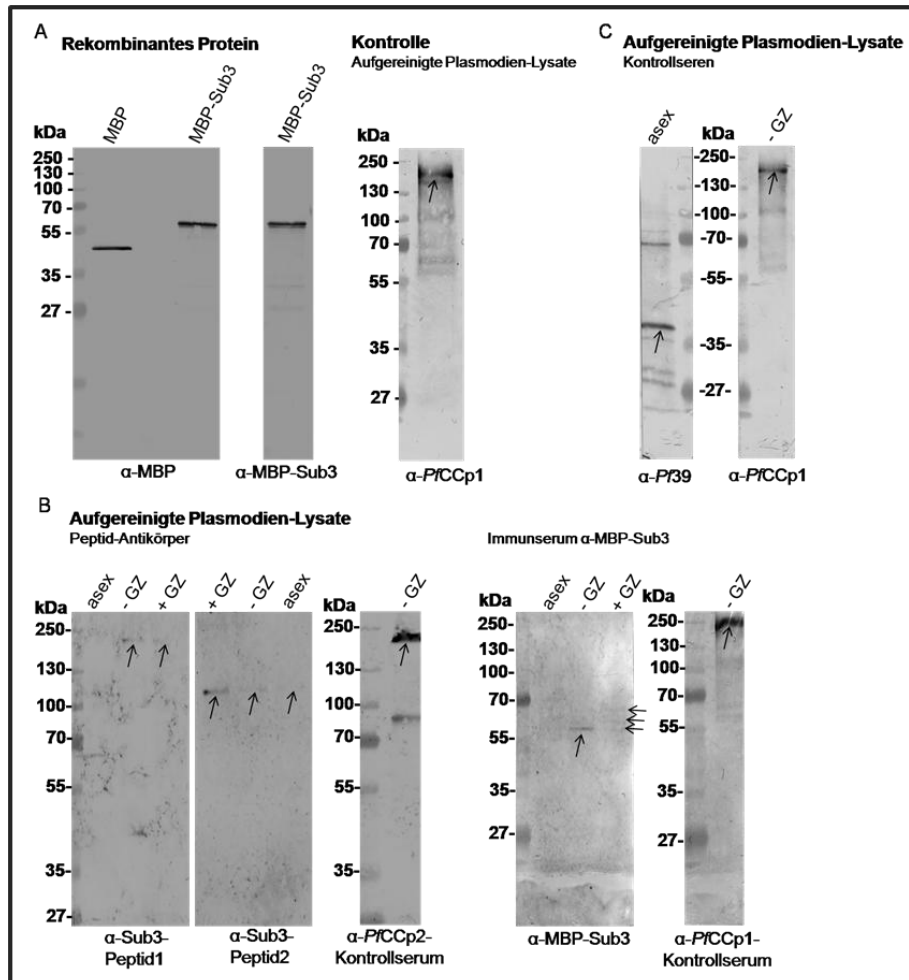


Abbildung 3.9. Test der Immunsereen gegen *Pf*Sub3 an rekombanantem Protein und wildtypischen Plasmodien. Rekombinante Proteine von MBP und MBP-Sub3 sowie Zelllysate asexueller Parasitenstadien und aktivierter und nicht-aktivierter Gametozyten von Wildtypparasiten wurden mittels SDS-Page aufgetrennt. Die Proteine wurden mit entsprechenden Antiseren in anschließenden Western-Blot-Studien untersucht. **A.** Die rekombinanten Proteine MBP und MBP-Sub3 wurden mit dem α -MBP Immunserum auf einer Höhe von ca. 40 bzw. 53 kDa detektiert. Das MBP-Sub3 Protein konnte mit dem α -MBP-Sub3 Immunserum ebenfalls auf einer Höhe von ca. 53 kDa nachgewiesen werden. **B.** Wildtypparasiten zeigten nach Auftrennung von nicht-aktivierten und aktivierten Gametozyten-Proben mit dem α -Sub3-Peptidantikörper 1 eine Bande auf einer Höhe zwischen 130 und 250 kDa. In den Proben asexueller Parasitenstadien konnte keine Bande detektiert werden. Der α -Sub3-Peptidantikörper 2 zeigte dagegen in aktivierten und nicht-aktivierten Gametozyten sowie in asexuellen Parasitenstadien eine Bande auf einer Höhe zwischen 100 und 130 kDa. Immunserum gegen MBP-Sub3 wies hingegen eine Bande in den nicht-aktivierten Gametozyten, und drei schwache Banden in den aktivierten Gametozyten zwischen 55 und 70 kDa auf. Die theoretische errechnete Größe von *Pf*Sub3 ohne proteolytische Prozessierungen beträgt 84 kDa. Als stadienspezifische Kontrolle für die aufgereinigten Wildtypparasiten diente Antiserum gegen *Pf*CCp1 bzw. *Pf*CCp2 in nicht-aktivierten Gametozyten (**A,B**) bzw. *Pf*39 in asexuellen Parasitenstadien (**C**). MBP, Maltose-Binde-Protein; asex, asexuelle Parasitenstadien; -GZ, nicht-aktivierte Gametozyten; + GZ, aktivierte Gametozyten; α -Sub3-Peptid, Peptidantikörper; kDa, Kilodalton; Pfeil, Proteinbanden.

Ergebnisse

Das Immuneserum α -MBP-Sub3 zeigte wiederum eine Proteinbande in den nicht-aktivierten Gametozyten, und drei schwache Banden in den aktivierten Gametozyten zwischen 55 und 70 kDa auf. Die entsprechende Positivkontrolle detektierte *PfCCp1* in nicht-aktiviertem Gametozytenlysat auf einer Höhe von etwas mehr als den erwarteten 185 kDa. Das asexuelle Gametozytenlysat wurde zur Kontrolle in Western-Blot-Studien in Kombination mit Antiserum gegen *Pf39* untersucht. *Pf39* wurde auf einer erwarteten Höhe von ca. 39 kDa detektiert (Abbildung 3.9C). Zusätzliche, unspezifische Banden traten dabei auf. Um die Größe der *Pf39*-Proteinbande zu verifizieren, wurde in der angrenzenden Spur des SDS-Gels nicht aktiviertes Gametozytenlysat aufgetragen. Die beiden untersuchten Lysate waren dabei nur durch eine mit Proteinmarker beladene Spur getrennt. Anschließende Western-Blot-Studien bestätigten *PfCCp1* unter Verwendung von entsprechendem Antiserum auf der erwarteten Höhe von ca. 185 kDa.

Die spezifische Immunmarkierung von *PfSub3* wurde anschließend unter Verwendung der Antiseren α -MBP-Sub3, α -Sub3-Peptidantikörper 1 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 mittels indirekter Immunfluoreszenz getestet. Als Negativkontrollen dienten entsprechende Präimmuneseren. Asexuelle Parasitenkulturen der Parasitenlinie F12 (Alano *et al.*, 1995) wurden Methanol-fixiert und indirekte Immunfluoreszenzstudien in Verbindung mit Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt (siehe 2.2.1.14). Um zu untersuchen, ob die Immunmarkierungen spezifisch waren, oder ob sie auf unspezifischen Bindungen der Antiseren an Proteine basierten, wurde zunächst ein sogenanntes Profil am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (LSM) erstellt. Dabei wird die Intensität des Fluoreszenzsignals an markierten, infizierten Erythrozyten und ebenfalls schwach markierten, nicht-infizierten Erythrozyten gemessen und miteinander verglichen. Die rote Linie im Ausschnitt der Übersichtsaufnahme zeigt die Messung der Fluoreszenzintensität der verschiedenen Zellen an, die im Diagramm als grüne Kurve dargestellt ist. Eine spezifische Immunmarkierung liegt vor, wenn ein Fluoreszenzsignal >200 detektiert wird. Die Immuneseren α -MBP-Sub3 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 markierten deutlich parasitierte Erythrozyten mit einer Fluoreszenzintensität >200 (Abbildung 3.10A,B). Im Vergleich dazu konnte von umliegenden ebenfalls schwach markierten nicht-infizierten Erythrozyten kein Fluoreszenzsignal gemessen werden. Diese Markierung war somit vernachlässigbar. Die Präimmuneseren zeigten in der Analyse eine schwache unspezifische Immunmarkierung von infizierten und nicht-infizierten Erythrozyten mit einem Fluoreszenzsignal deutlich <200 auf. Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung des Antiserums α -Sub3-Peptidantikörper 1 machten deutlich, dass die Immunmarkierung parasitierter Erythrozyten in diesem Fall mikroskopisch nicht eindeutig von nicht-parasitierten Erythrozyten zu unterscheiden war (Abbildung 3.10C).

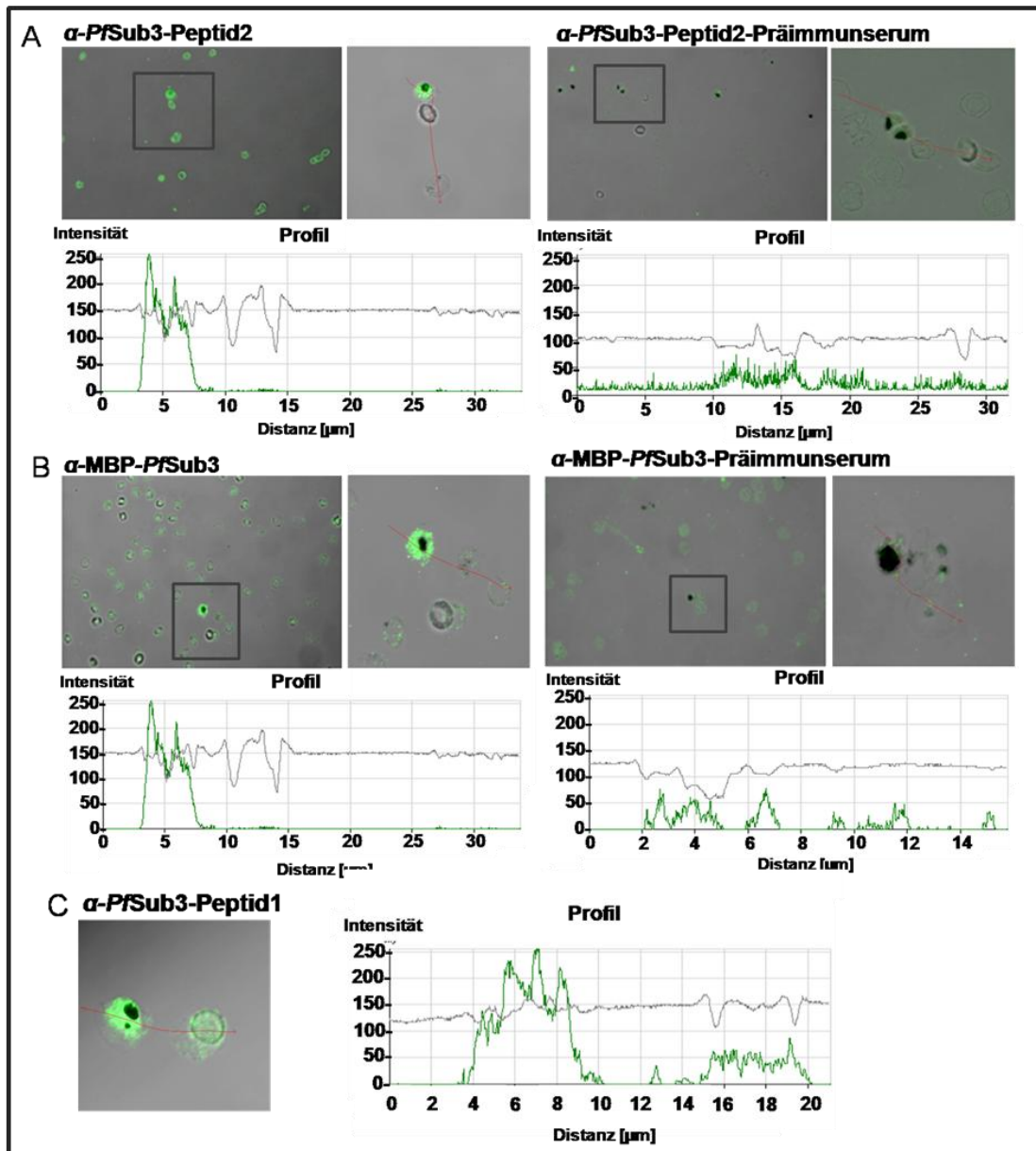


Abbildung 3.10. Untersuchung der Fluoreszenzstärke der Immunsereen gegen *PfSub3* in der indirekten Immunfluoreszenz. Asexuelle Parasitenstadien wurden fixiert und indirekte Immunfluoreszenzen durchgeführt. Die Immunsereen α -MBP-Sub3, α -Sub3-Peptidantikörper 1, α -Sub3-Peptidantikörper 2 und entsprechende Präimmunsereen wurden in Verbindung mit Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpern (grün) eingesetzt. **A,B.** Die Immunmarkierung der Parasiten mit α -MBP-Sub3 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 lieferte ein eindeutiges spezifisches Signal (Intensität > 200). Die Markierung von nicht-infizierten Erythrozyten war vernachlässigbar (Intensität < 200). Die Präimmunsereen zeigten dazu im Vergleich kein spezifisches Signal (Intensität < 200). **C.** Die Messung der Fluoreszenzintensität von immunmarkierten infizierten Erythrozyten unter Verwendung des Immunsereums α -Sub3-Peptidantikörper 1 detektierte ebenfalls ein Signal von > 200. Mikroskopisch waren infizierte und nicht-infizierte Erythrozyten allerdings nicht eindeutig voneinander unterscheidbar, weshalb auf folgende detaillierte Immunfluoreszenzstudien mit diesem Immunsereum verzichtet wurde. Die rote Linie im Ausschnitt der Immunfluoreszenzaufnahme stellt die Messung der Fluoreszenzintensität dar, dargestellt im Diagramm als grüne Kurve.

Ergebnisse

Die Messung der Fluoreszenzstärke der Proben unter Verwendung des Antiserums α -Sub3-Peptidantikörper 1 detektierte zwar ein Signal parasitierter Erythrozyten von <200 , jedoch zeigten umliegende nicht-infizierte Erythrozyten (zu erkennen am fehlenden schwarzen Malariapigment innerhalb der Zelle) ebenfalls Fluoreszenzsignale, die mikroskopisch von den infizierten Erythrozyten schwer unterscheidbar waren. Der Unterschied der gemessenen Fluoreszenzintensität zwischen parasitierten und nicht-parasitierten Erythrozyten war bei den Immunsereen α -MBP-Sub3 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 viel stärker und konnte auch mikroskopisch eindeutig verifiziert werden. Die Immunmarkierung des Antiserums α -Sub3-Peptidantikörper 2 wurde aus diesem Grund nicht detailliert beleuchtet.

Basierend auf den Ergebnissen des LSM-Profiles wurden die Immunsereen gegen *Pf*Sub3 in indirekten Immunfluoreszenzstudien eingesetzt (siehe 2.2.1.14), um die stadienspezifische Expression von *Pf*Sub3 zu untersuchen. Für die Immunmarkierung an asexuellen Parasitenstadien wurde die Parasitenlinie F12 verwendet, die keine Gametozyten ausbildet (Alano *et al.*, 1995). Die Immunsereen α -MBP-Sub3 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 wurden dabei in Verbindung mit Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpern verwendet. Stadienspezifische Kontrollmarkierungen wurden mit Antiseren gegen *Pf*MSP-1 (für die Markierung von asexuellen Parasitenstadien), *Pf*s25 (für die Markierung von Gametozyten und Makrogameten; Vermeulen *et al.*, 1985; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990; Scholz *et al.*, 2008) und *Pf*alpha-tubulinII (für die Markierung von aktivierten Mikrogametozyten; Rawlings *et al.*, 1992) in Verbindung mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt.

Beide Antiseren markieren *Pf*Sub3 in Trophozoiten, Schizonten, reifen Gametozyten, Makrogameten und Mikrogametozyten (Abbildung 3.11). Die Markierung erscheint punktiert oder homogen verteilt in Trophozoiten (Abbildung 3.11, Trophozoiten in der oberen Reihe im Vergleich zu Trophozoiten in der unteren Reihe). In Schizonten erscheint die Markierung ausschließlich punktiert. In Stadium-IV-Gametozyten erscheint die Markierung von *Pf*Sub3 entweder punktiert unter Einsatz des Antiserums α -MBP-Sub3 oder homogen verteilt unter Verwendung des Antiserums α -Sub3-Peptidantikörper 2. Die Markierung von *Pf*Sub3 liegt in Stadium-V-Gametozyten unter Verwendung beider Antiseren punktiert vor. Aktivierte Sexualstadien weisen für beide Antiseren ein ähnliches Muster der *Pf*Sub3-Markierung auf. Die Markierung von *Pf*Sub3 erscheint in aktivierten Stadium-IV/V-Gametozyten und Makrogameten homogen verteilt unter Einsatz des Antiserums α -MBP-Sub3 bzw. punktiert unter Verwendung des Antiserums α -Sub3-Peptidantikörper 2. Mikrogametozyten zeigen eine homogene Verteilung der *Pf*Sub3-Markierung unter Verwendung beider Antiseren.

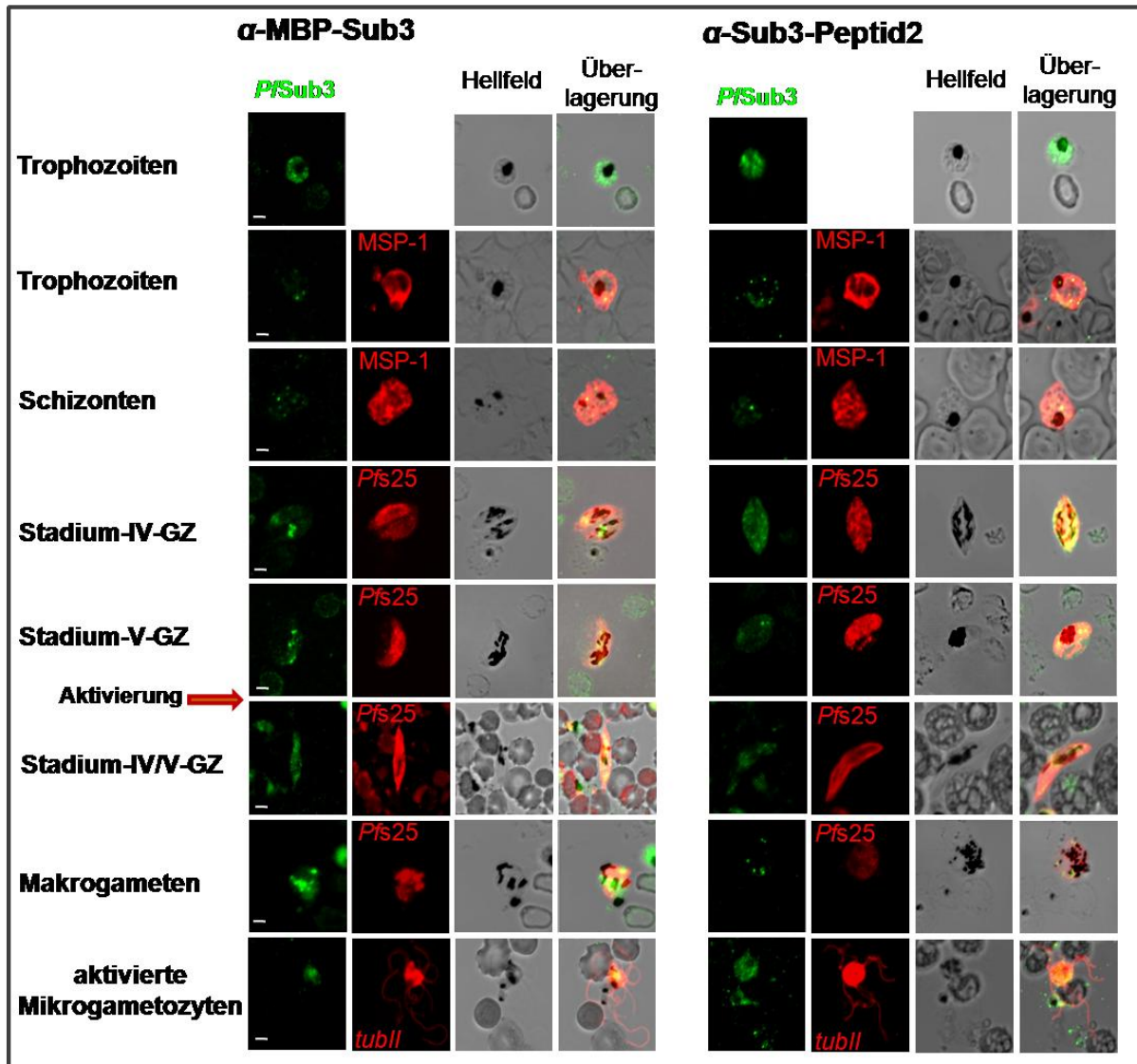


Abbildung 3.11. Immunlokalisation von *PfSub3* bei *P. falciparum*. Asexuelle Parasitenstadien und Sexualstadien wurden in Immunfluoreszenzstudien mit den Immunsereen α -MBP-Sub3 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 in Verbindung mit Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpern untersucht (grün). Für stadienspezifische Kontrollmarkierungen dienten Antiseren gegen *PfMSP-1*, *Pfs25* und *Pf*alpha-tubulinII in Verbindung mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern (rot). *PfSub3* zeigt eine punktartige bis homogene Verteilung in Trophozoiten, Schizonten sowie Stadium-IV-V-Gametozyten unter Verwendung beider Primärsereen auf. Aktivierte Sexualstadien weisen unter Einsatz beider Primärsereen ebenfalls eine punktartige bis homogene *PfSub3*-Markierung in Stadium-IV-V-Gametozyten, Makrogameten und Mikrogametozyten auf. GZ, Gametozyt; tubII, *Pf*alpha-tubulinII; Größenangabe, 2 μ m.

3.2 Die Charakterisierung neuartiger Gametenfilamente während der Gametogenese von *P. falciparum*

Die Erforschung neuartiger Zellausläufer, die von Gameten während der Gametogenese und im Laufe von Fertilisationsprozessen von *P. falciparum* gebildet werden, stellte einen weiteren zentralen Aspekt dieser Arbeit dar. Auf der Grundlage der im Folgenden beschriebenen Ergebnisse konnten die Gametenfilamente charakterisiert und beschrieben werden (Pradel *et al.*, in Revision).

3.2.1 Die Rolle von sexualstadienspezifischen Proteinen bei der Bildung neuartiger Gametenfilamente

Um die Zusammensetzung der Gametenfilamente und ihre Rolle bei Befruchtungsprozessen näher zu charakterisieren, wurden Immunfluoreszenzstudien mit sexualstadienspezifischen Oberflächenproteinen an filamentbildenden Gameten durchgeführt (siehe 2.2.1.14). Reife Gametozytenkulturen wurden durch Inkubation mit Aktivierungslösung 2 aktiviert und für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Objektträgern Methanol-fixiert und für Immunfluoreszenzstudien aufbereitet. Für die Immunlokalisation dienten Antiseren gegen *Pfs25*, *Pfs230*, *Pfs48/45* und *PfCCp4* in Verbindung mit Alexa-488- bzw. 594-gekoppelten Sekundärantikörpern. *Pfs25* wird auf der Oberfläche von nicht-aktivierten sowie aktivierten Gametozyten, Makrogameten, Zygoten und Ookineten exprimiert (Vermeulen *et al.*, 1985; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990; Scholz *et al.*, 2008). Immunmarkierungen von *Pfs25* ergaben, dass Makrogameten Zellausläufer mit einer Länge von mehreren Zelldurchmessern bilden können (Abbildung 3.12A). Mehrere Zellfilamente können dabei von der Oberfläche der Makrogameten ausgehen, und diese netzartig miteinander verbinden. Die Filamente erscheinen als dünne, tubuläre Strukturen und werden in periodischen Intervallen von knotenartigen Verdickungen unterbrochen. Bis zu neun Makrogameten konnten in einem Zellcluster detektiert werden, die durch die Filamente miteinander verbunden waren (Abbildung 3.12B). Die Proteine *Pfs230* und *Pfs48/45* werden auf der Oberfläche von Gametozyten und Gameten exprimiert (Reiner *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1986; Quakyi *et al.*, 1987; Williamson *et al.*, 1993; Williamson *et al.*, 1995). Immunmarkierungen mit entsprechenden Antiseren zeigten eine deutliche Expression von *Pfs230* und *Pfs48/45* auf der Oberfläche der Filamente (Pradel *et al.*, in Revision; Abbildung 3.12C; Tabelle 3.3).

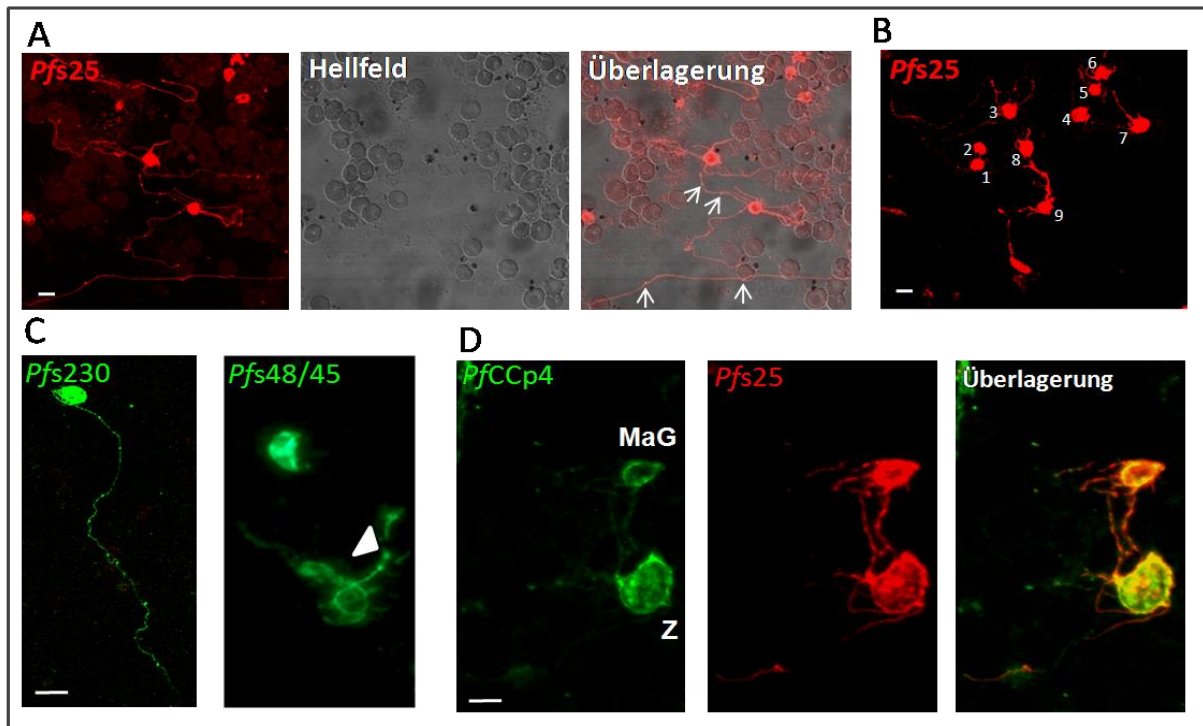


Abbildung 3.12. Die Assoziation sexualstadienspezifischer Proteine mit Zellfilamenten in *P. falciparum*. Reife Gametozytenkulturen wurden aktiviert und Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Zur Immunmarkierung dienten Antiseren gegen *Pfs25*, *Pfs230*, *Pfs48/45*, und *PfCCp4* in Verbindung mit Alexa-488(grün)- bzw. -594(rot)-gekoppelten Sekundärantikörpern. **A.** Mehrere Zellfilamente gehen von den *Pfs25*-positiven Makrogametenoberflächen aus und verbinden die Zellen miteinander. Die Filamente sind mehrere Zelldurchmesser lang und weisen in periodischen Intervallen auftretende, knotenartige Verdickungen auf. **B.** Bis zu neun Makrogameten können Filamente miteinander verbinden. **C.** *Pfs230* und *Pfs48/45* sind ebenfalls mit den Filamenten assoziiert (Pradel *et al.*, in Revision). **D.** *PfCCp4* befindet sich als weiteres typisches Gametenprotein auf der Oberfläche der Zellfilamente (Pradel *et al.*, in Revision), die Makrogameten und Zygoten miteinander verbinden können. MaG, Makrogamet; Z, Zygote; Pfeil, knotenartige Verdickung; gefülltes Dreieck, Filament; Größenangabe, 5 μ m.

PfCCp4 wird in Gametozyten, Makrogameten, Zygoten und Ookineten exprimiert (Scholz, 2007; Scholz *et al.*, 2008). Immunfluoreszenzstudien unter Einsatz von Antiseren gegen *PfCCp4* zeigten, dass Zellfilamente ausgehend von Makrogameten und ebenso Zygoten *PfCCp4*-positiv sind und diese Zellen miteinander verbinden können (Pradel *et al.*, in Revision; Abbildung 3.12D; Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3. Assoziation von sexualstadienspezifischen Proteinen und Zytoskelettproteinen mit Gametenfilamenten und deren Bildung in entsprechenden KO-Linien.

Protein	Stadium-spez. Expr.	Geschlechts-spez. Expr.	Filament-assoziiert	Filamente in entsprechenden KO-Linien
<i>Pfs230</i>	GZ, G	M, W	+	+
<i>Pfs48/45</i>	GZ, G	M, W	+	+
<i>PfCCp4</i>	GZ, G; Z, O	(W)	+	+
<i>Pfs25</i>	GZ, G, Z, O	(W)	+	n.v.
<i>Pfs16</i>	GZ	M, W	-	n.v.
<i>Pfact2</i>	GZ, G	M, W	+	n.v.
Alpha-tubulin	GZ, G, Z	M, W	-	n.v.

G, Gamet; GZ, Gametozyt; KO, Knockout; M, Männlich; n.v., KO-Linie nicht vorhanden; O, Ookinet; W, weiblich; Z, Zygote; (), vermutete Geschlechts-spezifische Expression; spez. Expr., spezifische Expression; -, nicht assoziiert; +, assoziiert.

Die Assoziation wichtiger sexualstadienspezifischer Proteine mit den von Gameten und Zygoten gebildeten membranösen Zellausläufern lieferte die Grundlage für die Erforschung der Frage, welche Rolle diese Proteine in der Filamentbildung spielen. Es wurden einige ausgewählte KO-Parasitenkulturen, in denen eines dieser Proteine nicht exprimiert wird, in Hinblick auf ihre Fähigkeit Filamente auszubilden untersucht. Die Parasitenlinien *PfCCp1-4-KO* (Pradel *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2009), *Pfs48/45-KO* (van Dijk *et al.*, 2001), und *Pfs230-KO* (Eksi *et al.*, 2002; Eksi *et al.*, 2006) wurden für die Analyse ausgewählt. Die *Pfs48/45-KO*-Parasiten bzw. die *Pfs230-KO*-Parasiten wurden von Prof. Dr. R. W. Sauerwein, Nijmegen, bzw. Prof. Dr. K.C. Williamson, Chicago, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die verwendete *Pfs230-KO*-Zelllinie produziert besonders viele Gametozyten (Prof. Dr. K.C. Williamson, unveröffentlichte Ergebnisse), und basiert auf dem genetischen Hintergrund der *Pfs230-KO*-Mutante D1 (Eksi *et al.*, 2002). Der Phänotyp der *PfCCp2*- und *PfCCp3-KO*-Parasiten zeigt eine Blockierung der Sporozitenwanderung aus den Oozysten in die Speicheldrüsen (Pradel *et al.*, 2004). *PfCCp4-KO*-Parasiten weisen eine zu Wildtypparasiten vergleichbare Befruchtungsfähigkeit und Oozystenproduktion auf (Scholz *et al.*, 2008). Die intraerythrozytäre Entwicklung von *PfCCp1-KO*-Parasiten und deren Verhalten in der Gametogenese ist von Wildtypparasiten ebenfalls nicht zu unterscheiden (Simon *et al.*, 2009). *Pfs48/45-KO*-Parasiten zeichnen sich durch eine reduzierte Befruchtungsfähigkeit der Mikrogameten aus und zeigen somit eine verminderte Produktion von Zygoten und Oozysten in der Stechmücke (van Dijk *et al.*, 2001). Die *Pfs230-KO*-Parasiten weisen eine reduzierte Fähigkeit der Bildung von Exflagellationszentren, der Bildung von Oozysten und der Stechmückeninfektion auf (Eksi *et*

Ergebnisse

al., 2006). Die Analyse der oben genannten KO-Parasitenlinien ergab, dass alle untersuchten Kulturen in der Lage waren, Gametenfilamente auszubilden (Pradel *et al.*, in Revision; Abbildung 3.13). Die Proteine *PfCCp1-4*, *Pfs48/45* und *Pfs230* scheinen keine direkte Voraussetzung für die Filamentbildung zu sein, obwohl sie mit deren membranösen Oberfläche assoziiert sind.

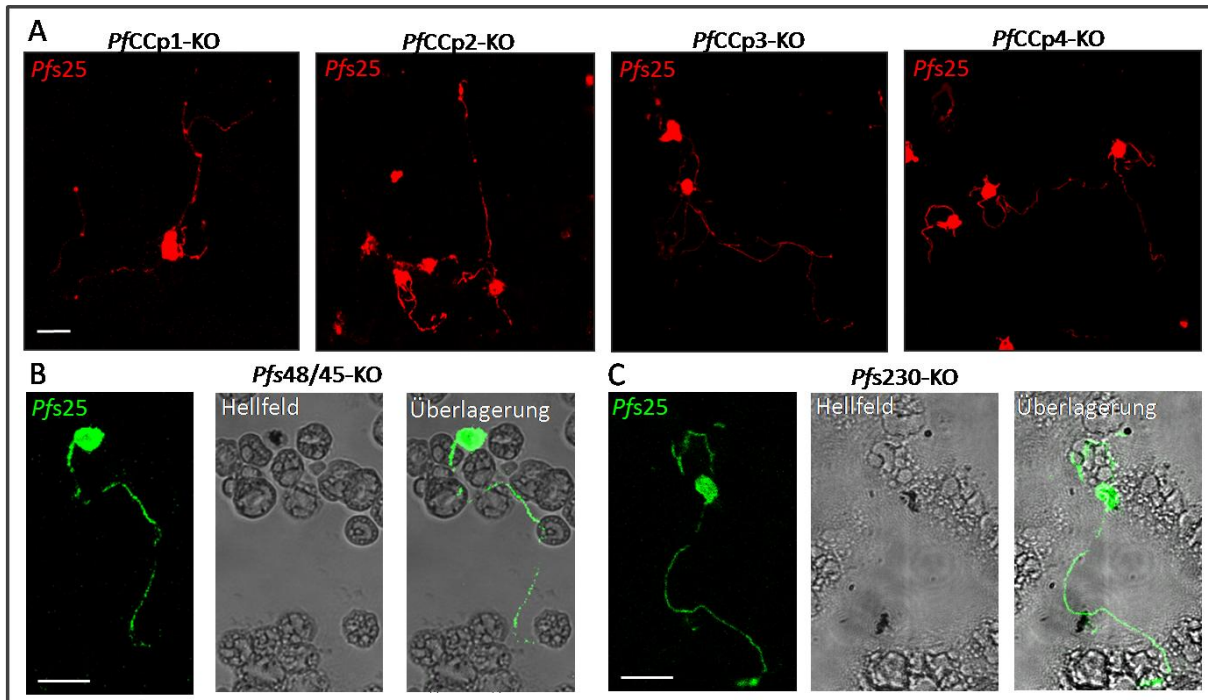


Abbildung 3.13. Die Bildung von Gametenfilamenten in KO-Parasitenkulturen sexualstadienspezifischer Proteine. Reife Gametozytenkulturen von *PfCCp1-4*-KO-Parasiten (A), *Pfs48/45*-KO-Parasiten (B) und *Pfs230*-KO-Parasiten (C) wurden aktiviert und Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Zur Immunmarkierung dienten Antiseren gegen *Pfs25* in Verbindung mit Alexa-488- (grün) bzw. -594-gekoppelten (rot) Sekundärantikörpern. Alle untersuchten KO-Parasiten bildeten filamentöse Zellausläufer aus (Pradel *et al.*, in Revision). Größenangabe, 10 µm.

3.2.2 Der Zeitpunkt der Filamentbildung und Evaluierung der Filamentlänge

Die unter 3.2.1 beschriebenen Zellausläufer stellen hauptsächlich von Makrogameten gebildete Zellausläufer dar, die nach der Aktivierung reifer Gametozytenkulturen auftreten. Nicht-aktivierte Kulturen bildeten keine vergleichbaren Strukturen. Es sollte nun herausgefunden werden, wann genau die Filamente nach Aktivierung der Sexualstadien auftreten. Reife Gametozytenkulturen wurden dafür aktiviert, und 5, 15, 30, 45 und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben fixiert und für Immunfluoreszenzanalysen aufbereitet (siehe 2.2.1.14). Zur Markierung der Makrogameten und Gametenfilamente diente Antiserum gegen *Pfs230* in Verbindung mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern. Es wurden je 30 Gesichtsfelder drei unabhängiger

Ergebnisse

Ansätze für jeden Zeitpunkt ausgewertet. Für die Analyse wurden alle filamentpositiven Makrogameten gezählt, und in Relation zu allen Makrogameten insgesamt gesetzt.

Bereits fünf Minuten nach Aktivierung der Gametozyten wiesen 33,43 % der Makrogameten ein oder mehrere Filamente auf (Abbildung 3.14A; die Originaldaten sind in Tabelle 7.4 im Anhang angegeben). 15 Minuten nach Gametozytenaktivierung waren 67,56 % aller Makrogameten filamentpositiv. Dieser Wert stieg auf 76,04 % 30 Minuten nach Aktivierung an. 45 bzw. 60 Minuten nach Aktivierung wiesen 73,28 % bzw. 70,53 % aller Makrogameten Filamente auf. Neben Makrogameten konnten ähnliche filamentöse Strukturen bei Zygoten (Abbildung 3.12D) detektiert werden (Pradel *et al*, in Revision).

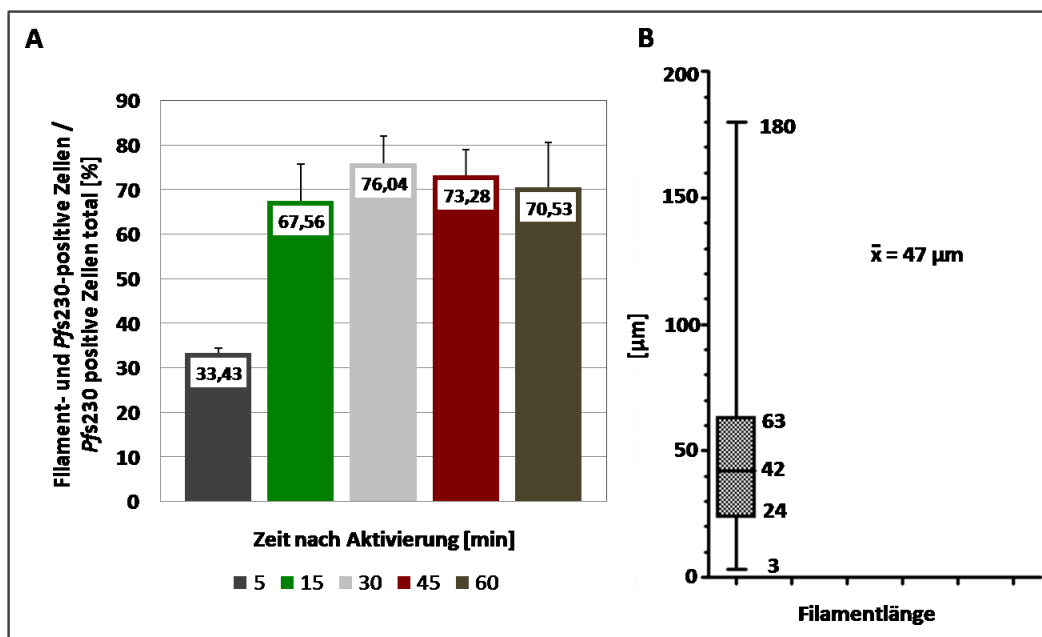


Abbildung 3.14. Analyse des Zeitpunktes der Filamentbildung und der Filamentlänge. Reife Gametozytenkulturen wurden aktiviert und nach 5, 15, 30, 45 und 60 Minuten (A) bzw. nach 30 Minuten (B) Inkubation bei Raumtemperatur fixiert. Immunmarkierungen mit Antiserum gegen *Pfs230* in Kombination mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. A. Die Anzahl der Filament- und *Pfs230*-positiven Makrogameten wurde in Relation zu den *Pfs230*-positiven Makrogameten insgesamt für jeden Zeitpunkt ausgewertet. Die Analyse erfolgte in 30 Gesichtsfeldern drei unabhängiger Ansätze, deren Mittelwerte im Diagramm angegeben sind. Bereits fünf Minuten nach Gametozytenaktivierung weisen ca. 33 % der Makrogameten Filamente auf. 15 Minuten nach Aktivierung zeigen ca. 68 % aller Makrogameten Filamente. 30 bis 60 Minuten nach Aktivierung weisen über 70 % der Makrogameten Zellausläufer auf. B. Analyse der Länge von 173 Gametenfilamenten, dargestellt als Box-Whisker-plot. Die Auswertung ergab, dass die Filamente im Mittel 47 µm lang sind und 50 % aller Filamente eine Länge zwischen 63 und 24 µm aufweisen. Es wurden Gametenfilamente in einer Länge von 3 µm bis zu 180 µm nachgewiesen. Der Median der Auswertung liegt bei 42.

Ergebnisse

Zur Evaluierung der Filamentlänge wurden 173 Gametenfilamente in Proben der oben beschriebenen Immunfluoreszenzanalyse untersucht (Fixierung 30 Minuten nach Aktivierung). Die Länge der Filamente variierte von 3 µm bis zu 180 µm, wobei 50 % aller Filamente eine Länge zwischen 24 und 63 µm aufwiesen. Der Mittelwert der Filamentlänge lag bei 47 µm (Abbildung 3.14B; Originaldaten in Tabelle 7.5 dem Anhang beigelegt).

3.2.3 Die Charakterisierung der Filamentmembran

Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von filamentbildenden Gameten und Zygoten zeigten sechs bis 12 Stunden nach Aktivierung eine deutliche Akkumulation dieser Zellen in Zellklustern auf. Immunmarkierungen mit *Pfs25* und *Pfs230*, wie beschrieben unter 3.2.1, zeigen, dass Makrogameten in Zellklustern auftreten, die auch Gametozyten beinhalten können (Abbildung 3.15A). Die Zellen können dabei mehrere von der Zelloberfläche ausgehende Filamente aufweisen, die die Zellen netzartig verbinden und umspannen (Abbildung 3.12A,B). Die Filamentoberfläche ist mit sexualstadienspezifischen Proteinen, darunter das Adhäsionsprotein *PfCCp4*, assoziiert (Vergleiche 3.2.1; Tabelle 3.3). Zusammen mit der Tatsache der adhäsiven Eigenschaft der Filamente und der Makrogametenklusterbildung deutet dies darauf hin, dass die Filamente aus der Parasitenmembran gebildet werden. Es sollte weiter untersucht werden, ob die parasitophore Vakuolenmembran oder die Erythrozytenmembran bei der Entwicklung der Filamente involviert sind. Hierzu wurden reife Gametozytenkulturen aktiviert, fixiert und für Immunfluoreszenzstudien aufbereitet (siehe 2.2.1.14). Antiserum gegen *Pfs16*, als spezifischer Marker für die PVM in Gametozyten (Baker *et al.*, 1994; Bruce *et al.*, 1994), wurde in Verbindung mit Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörpern in Immunmarkierungen verwendet. Die Aufbereitung der Proben und die Durchführung der Immunfluoreszenzstudien ohne deren Analyse wurden von Frau L. Sologub übernommen. Diese Untersuchung diente der Klärung der Fragestellung, ob die Filamente mit der PVM assoziiert sind. Ko-Markierungsstudien mit Antiserum gegen *Pfs25* zur Immunmarkierung der Filamente wurden in Verbindung mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Analyse ergab, dass die von Makrogameten gebildeten Zellfilamente nicht *Pfs16*-positiv, und somit nicht mit der PVM assoziiert sind (Pradel *et al.*, in Revision; Abbildung 3.15B; Tabelle 3.3). Zusätzlich wurden reife Gametozytenkulturen vor Aktivierung mit 0,05 % Saponin für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zweimal mit 1 x PBS gewaschen, fixiert und für Immunfluoreszenzstudien aufbereitet (siehe 2.2.1.14). Als Kontrollansätze dienten Kulturen, die ohne Saponinbehandlung für die Studien aufbereitet wurden. Antiserum gegen *Pfs25* diente zur Markierung der Zellfilamente und *Evans Blue* wurde zur Gegenfärbung der Erythrozyten verwendet. Die Durchführung ohne

Ergebnisse

die Auswertung der indirekten Immunlokalisationsstudien unter Zugabe von Saponin wurde von Frau L. Sologub übernommen. Die Inkubation der Gametozyten mit Saponin führt zum Verlust sowohl der PVM als auch der Erythrozytenmembran (Ansorge *et al.*, 1996). Die Immunmarkierungsstudien ergaben, dass die parasitären Zellfilamente trotz des Verlustes der zwei Membranen gebildet werden (Pradel *et al.*, in Revision; Abbildung 3.15C).

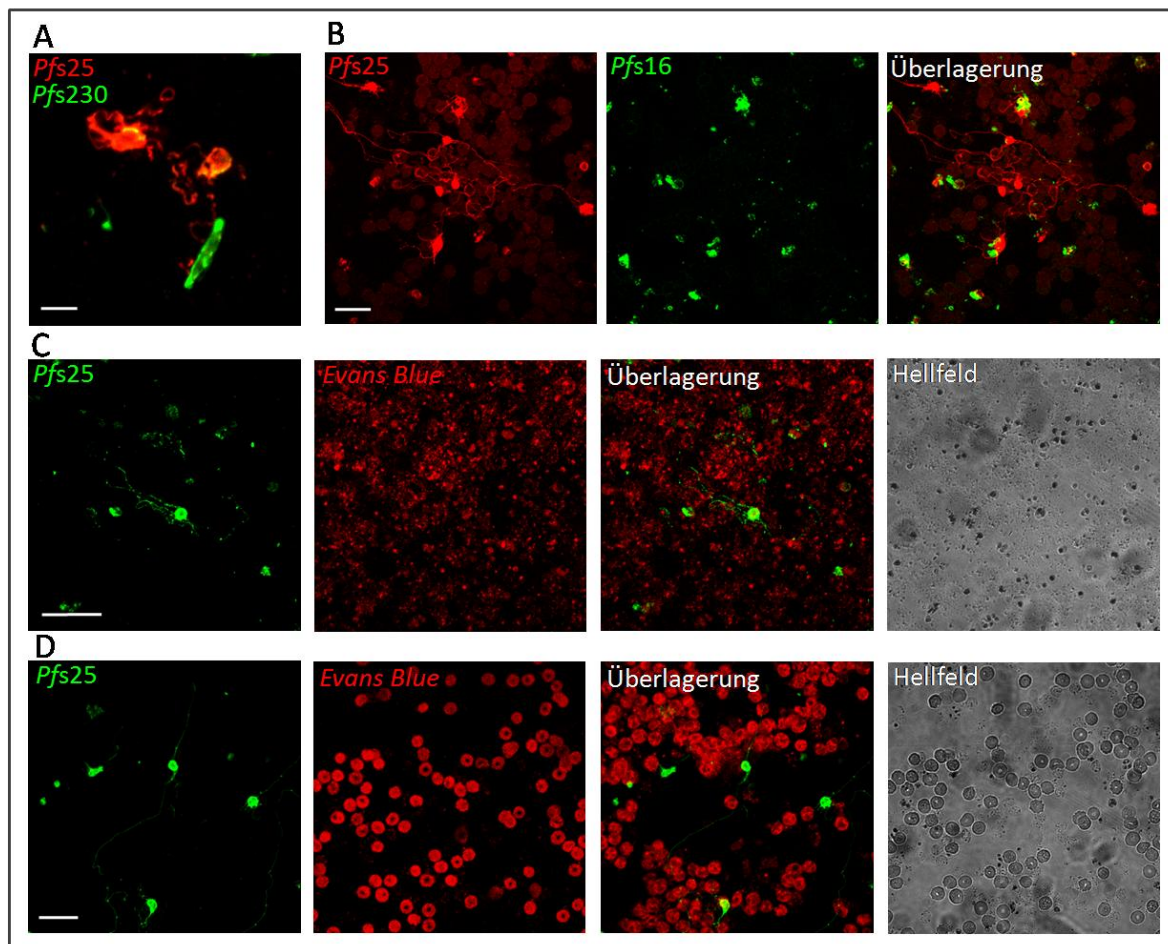


Abbildung 3.15. Zellklusterbildung aktivierter Makrogameten und die Rolle der parasitophoren Vakuolenmembran und Erythrozytenmembran bei der Filamententwicklung. Aktivierte Gametozytenkulturen wurden fixiert und für Immunfluoreszenzstudien aufbereitet. Vor Aktivierung wurden die Kulturen mit 0,05 % Saponin behandelt, um die Struktur der PVM sowie der Erythrozytenmembran zu zerstören (C). Antiserum gegen *Pfs25* markiert die Filamente, Antiserum gegen *Pfs230* markiert Gametozyten und Antiserum gegen *Pfs16* die PVM in Verbindung mit Alexa-488- (grün) bzw. -594-gekoppelten (rot) Sekundärantikörpern. Die Gegenfärbung der Erythrozyten erfolgte mittels *Evans Blue* (rot). **A.** Gameten bilden sechs bis 12 Stunden nach Aktivierung Zellkluster, die durch Gametenfilamente verbunden sind. Die Zellkluster können ebenfalls Gametozyten enthalten. **B.** Die die Zellkluster verbindenden Gametenfilamente sind nicht mit *Pfs16* assoziiert, was darauf hinweist, dass die PVM keine Rolle bei der Filamentbildung spielt (Pradel *et al.*, in Revision). **C.** Saponin-behandelte Kulturen bilden im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (**D**) morphologisch vergleichbare Zellfilamente (Pradel *et al.*, in Revision). Die PVM sowie die Erythrozytenmembran scheinen keine Rolle bei der Filamentbildung zu spielen (Pradel *et al.*, in Revision). Größenangabe, 5 μm (A), 20 μm (B-D).

Ergebnisse

Die gebildeten Filamente unter Einfluss von Saponin waren in der Morphologie mit Wildtypfilamenten vergleichbar, was die Studie der Kontrollansätze ohne Saponin verdeutlicht (Pradel *et al.*, in Revision; Abbildung 3.15D). Die Gegenfärbung der Erythrozyten mit *Evans Blue* veranschaulicht den Verlust bzw. die Integrität der Erythrozytenmembranstruktur (Vergleiche 3.15C und 3.15D). Die Tatsache, dass die Filamente mit typischen parasitären Gametenproteinen, aber nicht mit *Pfs16* assoziiert sind, und dass die Erythrozytenmembran nicht für ihre Bildung notwendig ist unterstützt die Annahme, dass die Filamente membranöse Zellausläufer der Makrogametenoberfläche darstellen (Pradel *et al.*, in Revision).

3.2.4 Die Rolle des Zytoskeletts in der Gametenfilamententwicklung

Die hier beschriebenen membranösen Zellausläufer bei Sexualstadien von *P. falciparum* sollten weiterhin in Hinblick auf ihre Zytoskelettzusammensetzung untersucht werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass ähnliche Zellfilamente in höheren eukaryotischen Zellen meist mit F-Actin assoziiert vorliegen, in seltenen Fällen ebenfalls mit Mikrotubuli (Davis & Sowinski, 2008; Gerdes & Carvalho, 2008). Unter Verwendung des Aktin-Inhibitors Cytochalasin B sowie des Tubulin-Inhibitors Colchicin sollte der Effekt auf die Filamentbildung untersucht und damit herausgefunden werden, ob Aktin oder Mikrotubuli Bestandteile der Filamente sind. Dafür wurde zunächst die Wirkung dieser Inhibitoren auf die Exflagellationsfähigkeit der Parasiten in Exflagellationsinhibitionsassays (siehe 2.2.1.10) getestet. Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen zwischen 10 nM und 50 nM eingesetzt. Die Analyse ergab, dass beide Inhibitoren die Exflagellation hemmen (Die Originaldaten sind in Tabelle 7.6 im Anhang angegeben). Abbildung 3.16A stellt graphisch die Mittelwerte des prozentualen Anteils der gebildeten Exflagellationszentren im Vergleich zu Inhibitor-unbehandelten Kontrollen dar. Cytochalasin B-behandelte Proben wiesen eine Mikrogametozytenexflagellation von 0,37 % bei einer Konzentration von 50 nM auf. Colchicin-behandelte Proben zeigten eine 0 %ige Exflagellation unter Verwendung einer Inhibitor-Konzentration von 50 nM. Die Hälfte aller Exflagellationszentren wurden bei einer Inhibitor-Konzentration von 34,03 nM für Cytochalasin B bzw. 27,09 nM für Colchicin gebildet.

Anschließend wurden die Parasiten der Ansätze, die mit 50 nM Inhibitor versetzt worden waren, nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten fixiert und für Immunfluoreszenzstudien aufbereitet (siehe 2.2.1.14). Antiserum gegen *Pfs230* diente in Verbindung mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern zur Markierung der Filamente, wie beschrieben unter 3.2.2. Es wurden alle filamentpositiven Makrogameten gezählt, und in Relation zu allen Makrogameten insgesamt gesetzt (die Originaldaten sind in Tabelle 7.7 im Anhang

Ergebnisse

angegeben). Die Analyse ergab, dass Cytochalasin B und Colchicin die Filamentbildung in Makrogameten signifikant hemmen (Abbildung 3.16B). In den mit Cytochalasin B behandelten Kulturen wiesen 60,14 % der Makrogameten Zellfilamente auf. Inhibitor-unbehandelte Kontrollproben zeigten hingegen, dass 89,69 % aller Makrogameten Zellausläufer aufwiesen. In Colchicin-behandelten Kulturen waren 66,5 % aller Makrogameten filamentpositiv. Die Makrogametenfilamentbildung benötigt offensichtlich Zellprozesse, die durch Aktin- und Tubulin-Inhibitoren gehemmt werden können.

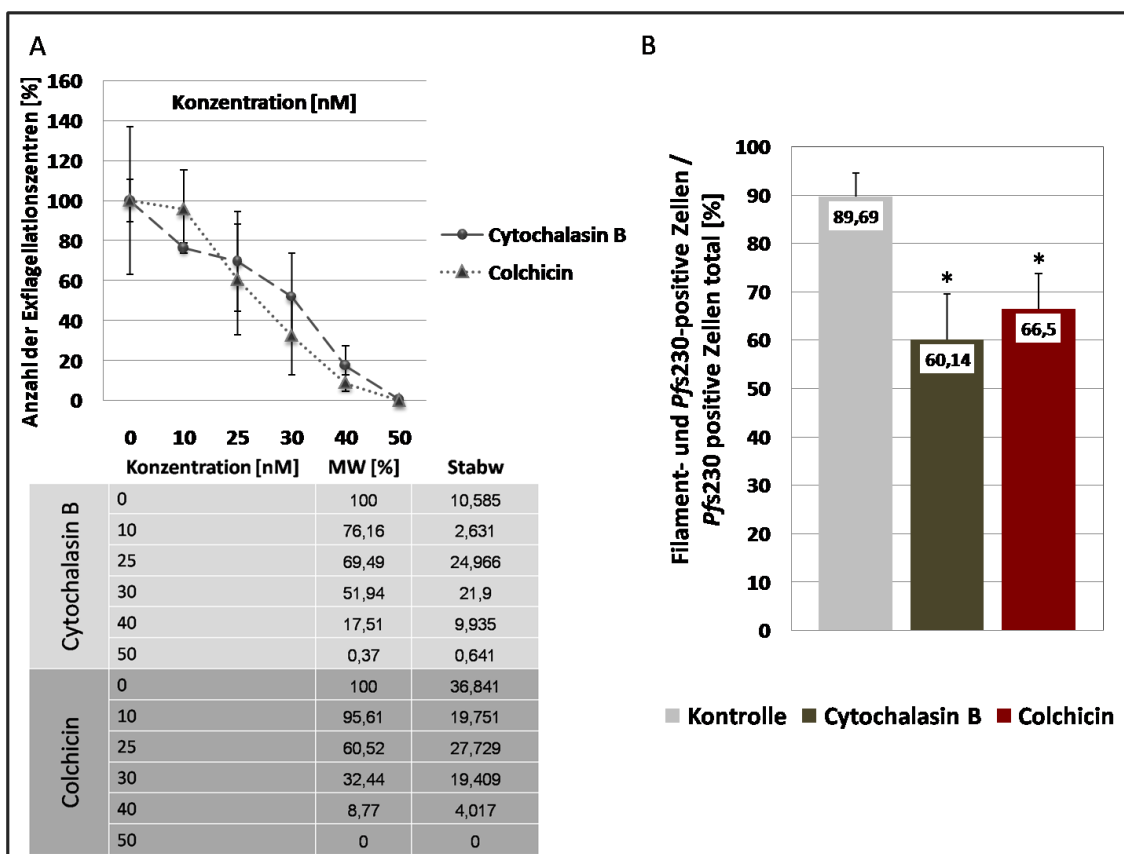


Abbildung 3.16. Die Rolle von Aktin und Tubulin bei der Exflagellationszentren- und Zellfilamentbildung. **A.** Reife Gametozytenkulturen wurden mit dem Aktin-Inhibitor Cytochalasin B bzw. Tubulin-Inhibitor Colchicin in Konzentrationen zwischen 10 nM bis 50 nM inkubiert und die Exflagellationsfähigkeit mittels EIA analysiert. Die Ergebnisse wurden in Relation zu unbehandelten Kontrollen gesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen drei unabhängiger Auszählungen von je 30 Gesichtsfeldern sind angegeben. Beide Inhibitoren reduzieren die Exflagellationsfähigkeit bis auf 0 bzw. nahe 0 % in einer Konzentration von 50 nM. **B.** Die Kulturen aus den Exflagellationsinhibitionsassays wurden fixiert, und die Zellfilamentbildung mittels Antiserum gegen *Pfs230* in Verbindung mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern in Immunfluoreszenzstudien analysiert. Die Anzahl *Pfs230*- und filamentpositiver Makrogameten wurde in Relation zu den *Pfs230*-positiven Makrogameten insgesamt gesetzt und in je 30 Gesichtsfeldern drei unabhängiger Ansätze ausgewertet. Beide Inhibitoren hemmen die Zellfilamentbildung signifikant. Student's t-Test, $P < 0,05$. *, signifikant.

Ergebnisse

Das Genom von *P. falciparum* kodiert für zwei unterschiedliche Aktin Gene, *Pfact1* und *Pfact2* (Wesseling *et al.*, 1988). Während *Pfact1* im gesamten Zyklus von *P. falciparum* exprimiert wird, weist *Pfact2* eine sexualstadienspezifische Expression auf (Wesseling *et al.*, 1989; Schüler & Matuschewski, 2006). Es sollte nun untersucht werden, ob Aktin bzw. Mikrotubuli direkt mit den Filamenten assoziiert sind. Dafür wurden aktivierte Gametozytenkulturen fixiert und für Immunfluoreszenzstudien aufbereitet (siehe 2.2.1.14). Für die Darstellung von *Pfact2* wurden die aktivierten Gametozytenkulturen für drei Stunden mit 1 μM Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat (TRITC)-Phalloidin (Molecular Probes, Schüler *et al.*, 2005) als Aktinstabilisator inkubiert, was in Zusammenarbeit mit Frau L. Sologub erfolgte. Für die Immunmarkierungen wurde Antiserum gegen *Pfact2* oder *Pfs25* und ein monoklonaler anti- α -tubulin Antikörper in Verbindung mit Alexa-488- bzw. Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern eingesetzt. Die Immunmarkierungen ergaben, dass die von Makrogameten gebildeten Zellausläufer mit *Pfact2* assoziiert sind (Pradel *et al.*, in Revision; Abbildung 3.17A; Tabelle 3.3). Kollokalisationsstudien mit *Pfs25* zur Markierung der Zellfilamente zeigten hingegen keine Assoziation der Filamente mit α -Tubulin (Abbildung 3.17B; Pradel *et al.*, in Revision).

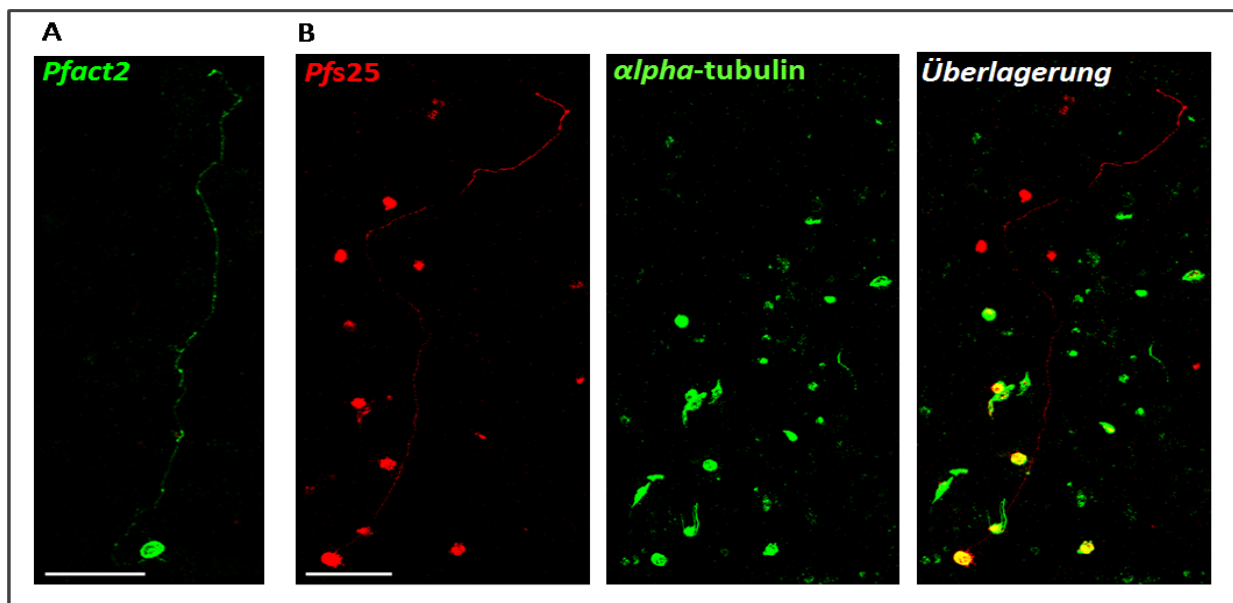


Abbildung 3.17. Die Rolle von Aktin und Tubulin bei der Zellfilamentbildung. Reife Gametozytenkulturen wurden aktiviert, fixiert und die Zellfilamente in Immunfluoreszenzstudien mittels Antiserum gegen *Pfact2* (A), *Pfs25* (B) und α -tubulin (B) in Verbindung mit Alexa-488- (grün) bzw. -594-gekoppelten (rot) Sekundärantikörpern untersucht. Das sexualstadienspezifische Aktin, *Pfact2*, ist mit den Filamenten assoziiert, während α -tubulin nicht mit den Filamenten kollokalisiert (Pradel *et al.*, in Revision). *Pfs25* markiert die Oberfläche der Zellfilamente. Größenangabe, 20 μm .

3.2.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Filamentmorphologie

Um die Gametenfilamente in ihrer dreidimensionalen Struktur zu analysieren wurden rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchungen durchgeführt (siehe 2.2.1.15). Aktivierte Gametozytenkulturen wurden als Tropfen auf Deckgläser aufgebracht und die Zellen für eine Stunde sedimentieren lassen. Anschließend wurden die Proben in-Lösung fixiert und am nächsten Tag für die REM-Analyse vorbereitet. Die Untersuchungen zeigten, dass von der Makrogametenoberfläche bis zu neun Zellfilamente und mehrere Zellfilamentansätze ausgehen können (Abbildung 3.18A).

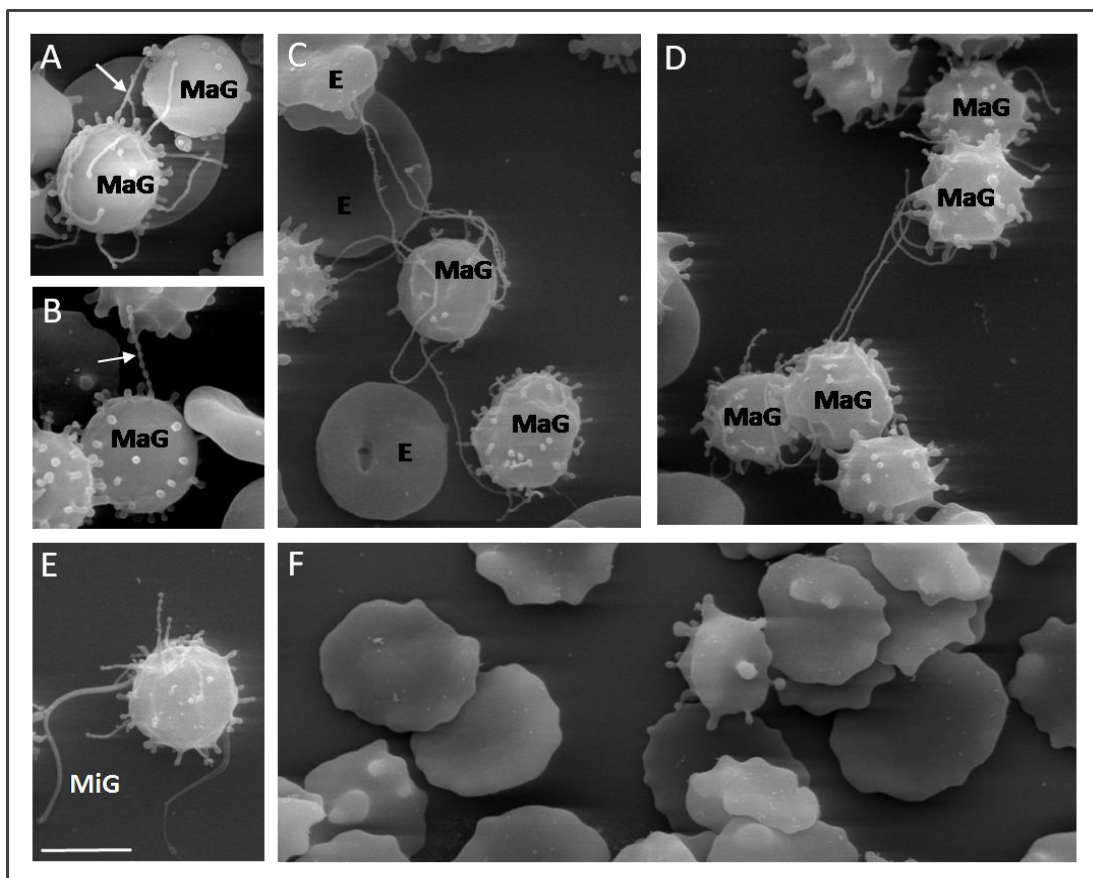


Abbildung 3.18. Morphologie der Gametenfilamente im Rasterelektronenmikroskop. Gametozytenkulturen wurden aktiviert, fixiert und für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen vorbereitet. **A.** Makrogameten wiesen mehrere Filamente und Filamentansätze, ausgehend von ihrer Oberfläche, auf (Pradel *et al.*, in Revision). **A,B.** Die Filamente zeigten eine perlschnurartige Struktur auf, besaßen einen Durchmesser von ca. 200 nm und waren am Ende geschlossen (Pradel *et al.*, in Revision). **C,D.** Zellfilamente konnten Makrogameten, sowie Erythrozyten miteinander verbinden (Pradel *et al.*, in Revision). **E.** Mikrogameten unterschieden sich deutlich von den Gametenfilamenten aufgrund ihrer glatten Oberfläche und einer Länge von ca. 15 µm (Pradel *et al.*, in Revision). **F.** Nicht-infizierte Erythrozyten bildeten keine vergleichbaren Strukturen bei gleicher Aufbereitung der Proben (Pradel *et al.*, in Revision). E, Erythrozyt; MaG, Makrogamet; MiG, Mikrogamet; Pfeil, perlschnurartige Struktur; Größenangabe, 10 µm.

Ergebnisse

Die Analysen zeigten weiterhin, dass die Filamente am Ende geschlossen sind und einen Durchmesser von ca. 200 nm besitzen (Abbildung 3.18A,B; Pradel *et al.*, in Revision). Auffällig war dabei ihre perlschnurartige Struktur. Die Zellfilamente verbanden Makrogameten miteinander und adhärten an umliegende Erythrozyten (Abbildung 3.18C,D; Pradel *et al.*, in Revision). Mikrogameten wiesen im Vergleich zu den Gametenfilamenten eine glatte Oberfläche auf und waren ca. 15 µm lang (Abbildung 3.18E; Pradel *et al.*, in Revision). Kontrollansätze nicht-infizierter Erythrozyten (Abbildung 3.18F) zeigten dagegen keine vergleichbaren Filamente auf (Pradel *et al.*, in Revision).

3.2.6 Live-imaging-Analysen der Zellfilamente

Eine wichtige Fragestellung bei der Charakterisierung der Gametenfilamente war, ob deren Bildung lichtmikroskopisch an lebenden, nicht-fixierten Parasiten verfolgt werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden reife Gametozytenkulturen aktiviert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Parasitenkulturen wurden anschließend mit dem Farbstoff LysoTracker-Red versetzt, für weitere fünf Minuten inkubiert und auf Objektträger transferiert (siehe 2.2.1.11). Im Anschluss erfolgte die Analyse der verschiedenen Parasitenstadien in Hinblick auf die Filamentbildung am Fluoreszenzmikroskop. Der Farbstoff LysoTracker verteilte sich homogen intrazellulär in asexuellen Parasitenstadien (Trophozoiten, Schizonten), Gametozyten, Makro-, und Mikrogameten (Pradel *et al.*, in Revision; Abbildung 3.19A). Nicht-infizierte Erythrozyten zeigten eine nur schwache Hintergrundfärbung mit dem Farbstoff. Es konnte gezeigt werden, dass Makrogameten zum Zeitpunkt der Befruchtung mehrere kurze Zellfilamente aufweisen können. Von Makrogameten ausgehende Zellfilamente wurden ebenfalls mit dem Farbstoff LysoTracker gefärbt und konnten sich an intrazelluläre asexuelle Parasitenstadien anheften (Abbildung 3.19B). Die Zellfilamente lebender Makrogameten wurden auch im Hellfeld beobachtet (Abbildung 3.19C). 12 Stunden nach der Gametozytenaktivierung war eine auffällige Klusterbildung von zellfilamentbildenden Makrogameten zu beobachten (Abbildung 3.19D), wie beschrieben unter 3.2.3. Es konnte dokumentiert werden, wie die Zellfilamente lebender Makrogameten aktiv bewegt werden (Pradel *et al.*, in Revision). In Abbildung 3.19E ist ein Standbild einer Videosequenz dargestellt, die einen Makrogameten ca. drei Stunden nach Aktivierung der Gametozytenkultur zeigt. Dieser Makrogamet wies ein ca. 25 µm langes Zellfilament und mehrere kurze Zellausläufer auf. Das lange Zellfilament wurde innerhalb von ca. 37 Minuten aktiv zum Zellkörper eingezogen, was einer Geschwindigkeit von 0,68 µm/Minute entspricht, und verkürzte sich dabei um mehr als die Hälfte (Pradel *et al.*, in Revision). Die Videoaufnahme der Sequenz wurde dem Anhang auf CD beigefügt ('aktives Filament', Hellfeld- und/oder Fluoreszenzaufnahme). Zum Vergleich

Ergebnisse

wurden Videoaufnahmen eines exflagellierenden Mikrogametozyten ('exflagellierender Mikrogametozyt2') sowie die eines Makrogametenfilamentes beigefügt, das sich passiv im Mediumfluss bewegt ('Filament im Mediumfluss', Fluoreszenzaufnahme sowie Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme).

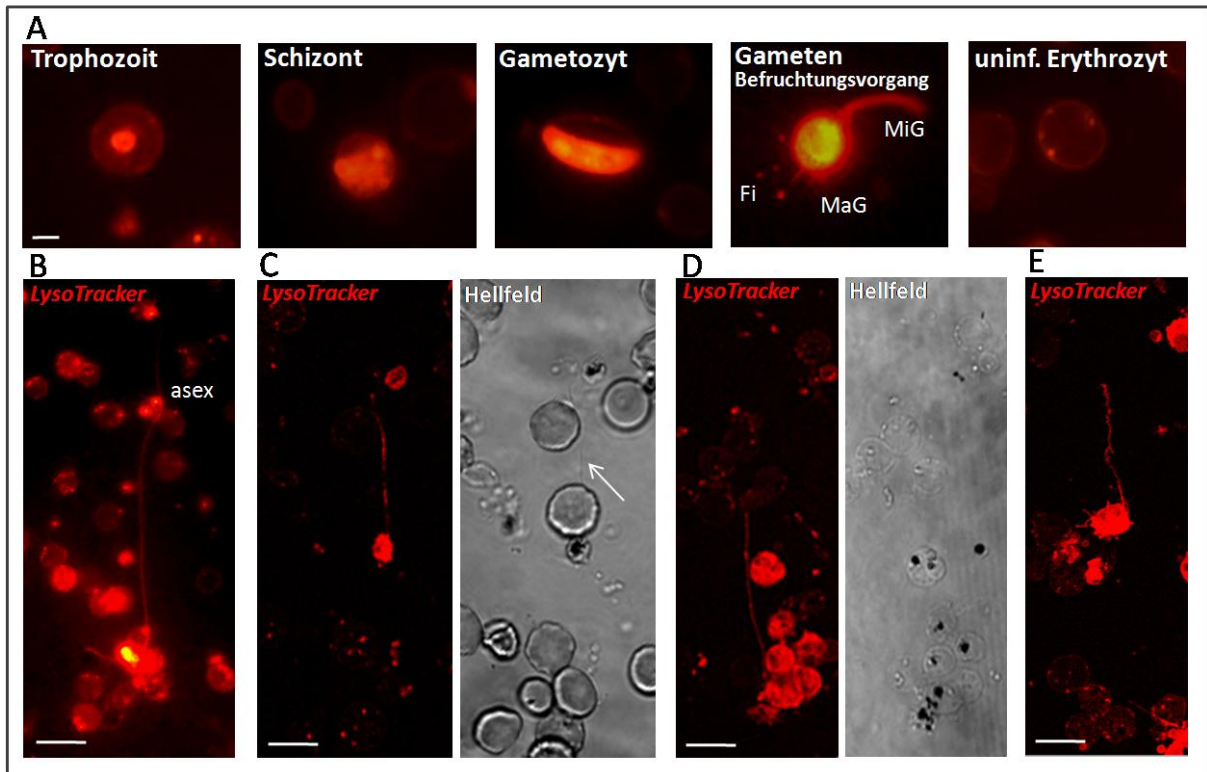


Abbildung 3.19. LysoTracker-Markierung lebender Parasitenstadien und Analyse der Gametenfilamente. Aktivierte Gametozytenkulturen wurden mit dem Farbstoff LysoTracker-Red (rot) versetzt, und nach fünfminütiger Inkubation fluoreszenzmikroskopisch untersucht. **A.** Der Farbstoff wies eine homogene, intrazelluläre Markierung asexueller Parasitenstadien, Gametozyten, und Gameten auf (Pradel *et al.*, in Revision). Makrogameten mit mehreren Zellfilamentansätzen konnten befruchtet werden. Typische Gametenfilamente adhärten an intrazelluläre, asexuelle Parasitenstadien (**B**) und wurden ebenfalls im Hellfeld beobachtet (**C**). **D.** Zellklusterbildung von lebenden Makrogameten mit Zellausläufern 12 Stunden nach Aktivierung. **E.** Standbild einer Videosequenz, die einen Makrogameten mit einem ca. 25 μm langen Zellfilament zeigt, welches aktiv innerhalb von ca. 37 Minuten eingezogen wurde (Pradel *et al.*, in Revision). Asex, asexuelle Parasitenstadien; Fi, Filament; MiG, Mikrogamet; MaG, Makrogamet; uninf. Erythrozyt, uninfizierter Erythrozyt; Pfeil, Filament. Größenangabe, 2 μm (A), 20 μm (B, C), 10 μm (D, E).

Die homogene Färbung des gesamten Parasiten liess darauf schließen, dass der Farbstoff LysoTracker offenbar in die Zelle eindringt und dort im Zytoplasma akkumuliert. Die von Makrogameten gebildeten Filamente scheinen ebenso zytoplasmatisches Material zu beinhalten, da sie auch mit dem Farbstoff markiert werden konnten.

Ergebnisse

Zusätzlich wurde die Filamentbildung in lebenden Makrogameten der GFP-exprimierenden Parasitenlinie 5'CAM.GFP untersucht (Eksi *et al.*, 2008), welche von Prof. Dr. K.C. Williamson, Chicago, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. GFP wird in dieser Parasitenlinie episomal unter der Kontrolle des Calmodulin-Promotors exprimiert, was in einer grünen Färbung des gesamten Parasiten resultiert. Gametozytenkulturen wurden aktiviert und nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es konnten Makrogameten beobachtet werden, die GFP-positive Zellausläufer aufweisen (Abbildung 3.20A; Pradel *et al.*, in Revision).

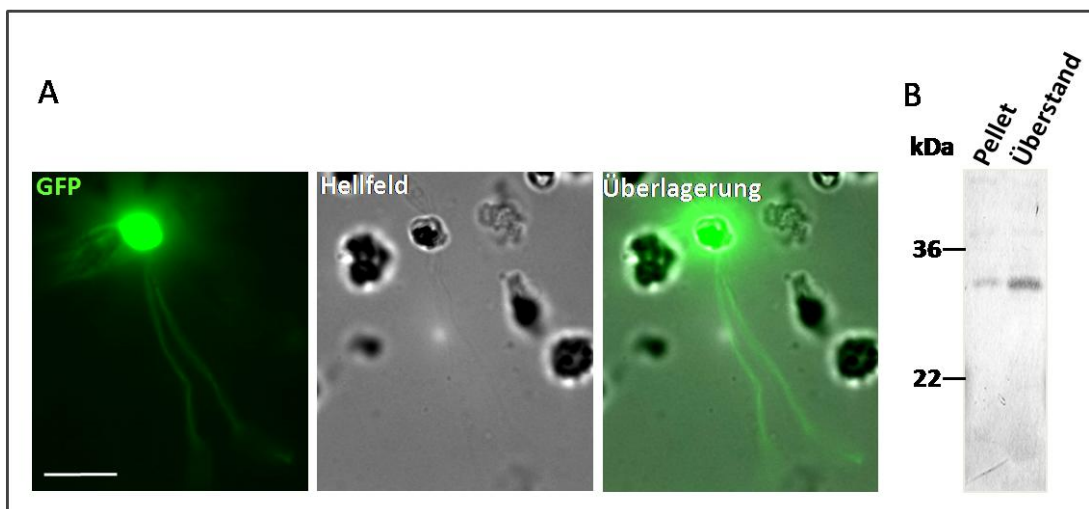


Abbildung 3.20. Lebende Makrogameten bilden filamentartige, zytoplasmagefüllte Zellausläufer in GFP-exprimierenden Parasiten. **A.** Gametozytenkulturen der GFP-exprimierenden Parasitenlinie 5'CAM.GFP wurden aktiviert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Makrogameten wiesen GFP-positive Zellausläufer auf, die ebenfalls im Hellfeld sichtbar sind (Pradel *et al.*, in Revision) **B.** Asexuelle Parasitenkulturen von 5'CAM.GFP wurden aufgereinigt und aufgetrennt in hydrophobe (Pellet) und hydrophile Zellbestandteile (Überstand). Die Proben wurden mittels SDS-Page separiert und in Western-Blot-Analysen mit α -GFP-Serum in Verbindung mit Alkalischer Phosphatasegekoppelten Sekundärantikörpern untersucht. Die Analyse zeigte eine deutliche Bande für das GFP-Protein in der hydrophilen Zellfraktion und eine schwache Bande in der hydrophoben Zellfraktion auf einer Höhe von ca. 26 kDa auf. Da das GFP-Protein in der Parasitenlinie 5'CAM.GFP hauptsächlich in der löslichen Zellfraktion akkumulierte, ließ dies darauf schließen, dass die GFP-positiven Gametenfilamente mit löslichen Zellbestandteilen des Zytoplasmas gefüllt sind. Größenangabe, 10 μ m.

Um herauszufinden, ob das Protein GFP in 5'CAM.GFP-Parasiten im Zytoplasma akkumuliert, wurden asexuelle Parasitenkulturen dieser Parasitenlinie aufgereinigt und anschließend in hydrophile und hydrophobe Zellbestandteile aufgetrennt (siehe 2.2.3.3). Die Proben wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und in Western-Blot-Analysen mit α -GFP-Serum in Verbindung mit Alkalischer Phosphatasegekoppelten Sekundärantikörpern

Ergebnisse

untersucht (siehe 2.2.3.4 und 2.2.3.7). GFP konnte als deutliche Bande in der hydrophilen Zellfraktion (Überstand) auf einer Höhe von ca. 26 kDa detektiert werden (Abbildung 3.20B). Die hydrophobe Zellfraktion (Pellet) wies eine schwache Bande für das GFP-Protein auf, was wahrscheinlich auf eine Verunreinigung der unlöslichen Zellfraktion durch Wasserrückstände zurückzuführen ist. Da das GFP-Protein in den 5'CAM.GFP-Parasiten hauptsächlich in der löslichen Zytoplasmazellfraktion akkumulierte, wies dies darauf hin, dass die GFP-positiven Makrogametenfilamente ebenso Zytoplasma enthalten. Dies bestätigte die Vermutung der zytoplasmagefüllten Filamente (Pradel *et al.*, in Revision) aus den oben aufgeführten LysoTracker-Experimenten.

3.2.7 Gametenfilamente im natürlichen System

Die Bildung der Gametenfilamente konnte bisher *in vitro* anhand aktivierter Gametozytenkulturen dargestellt werden. Weitere Experimente sollten beweisen, dass die Filamente keine Zellstrukturen sind, die aufgrund der *in-vitro*-Kultivierung des in den Untersuchungen eingesetzten Laborstammes NF54 entstehen. Im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass ähnliche Zellausläufer in einem Feldisolat auftreten, welches sich zum Zeitpunkt der Untersuchung erst vier Monate in Kultur befand (Pradel *et al.*, in Revision). Um die Gametenfilamentbildung *in vivo* zu analysieren, wurden nicht-aktivierte Gametozytenkulturen *Anopheles-stephensi*-Stechmücken gefüttert. zehn Minuten nach Beginn der Fütterung wurde der Mitteldarminhalt auf einen Objektträger transferiert und lichtmikroskopisch untersucht (siehe 2.2.1.5). Es konnten lebende Makrogameten mit typischen Gametenfilamenten im Hellfeld beobachtet werden (Abbildung 3.21A; Pradel *et al.*, in Revision).

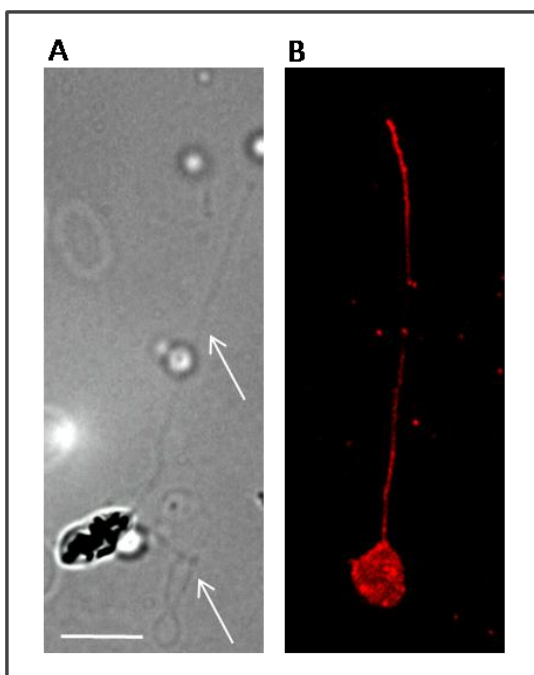


Abbildung 3.21. Makrogameten bilden *in vivo* Filamente. Nicht-aktivierte Gametozytenkulturen wurden *A. stephensi*-Stechmücken gefüttert, und der Mitteldarminhalt zehn Minuten (A) bis 6 Stunden (B) später untersucht. A. Die lichtmikroskopische Analyse lebender Makrogameten zeigt die Filamentbildung *in vivo* (Pradel *et al.*, in Revision). B. Der Mitteldarminhalt wurde anschließend fixiert und in Immunfluoreszenzstudien mit Antiserum gegen *Pfs25* in Verbindung mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern (rot) untersucht. *In-vivo*-generierte, fixierte Makrogameten weisen ebenfalls Filamente auf (Pradel *et al.*, in Revision). Pfeil, Filament; Größenangabe, 10 μm .

Ergebnisse

Zusätzlich wurde in Zusammenarbeit mit Herrn cand. biol. R. Frank der Mitteldarminhalt der Stechmücken anschließend fixiert und für Immunfluoreszenzanalysen aufbereitet (siehe 2.2.1.14). Antiserum gegen *Pfs25* in Verbindung mit Alexa-594-gekoppelten Sekundärantikörpern konnte die Bildung der Filamente in Makrogameten *in vivo* ebenfalls beweisen (Pradel *et al.*, in Revision; Abbildung 3.21B). Eine artifizielle Bildung der Filamente aufgrund der *in-vitro*-Kultivierung konnte somit ausgeschlossen werden. Die Gametenfilamente scheinen vielmehr Strukturen darzustellen, die von vitalen Sexualstadien entwickelt und benutzt werden (Pradel *et al.*, in Revision).

4 Diskussion

4.1 Proteasen bei *P. falciparum* und ihre Bedeutung in der Malariaforschung

Jährlich sterben über eine Million Menschen an Malaria trotz intensiver Bemühungen der WHO und anderer Organisationen, diese Tropenkrankheit einzudämmen (Bremner, 2009). Wachsende Resistenzen der Malariaerreger gegenüber verfügbaren Medikamenten erhöhen den Druck, neue wirksame Medikamente zu entwickeln und einen Impfstoff gegen diese Krankheit herzustellen. Transmissionsblockierende Strategien (TBS) stellen eine Möglichkeit dar, die Verbreitung der Malariaerreger zu unterbinden. TBS zielen auf die Sexualphase von *Plasmodium* ab, mit dem Ziel eine erfolgreiche Befruchtung und spätere Oozystenentwicklung im Mitteldarm der Stechmücke zu unterbinden. TBS lassen sich in die transmissionsblockierenden Medikamente (TBM) und Vakzine (TBV) untergliedern. Für die Entwicklung eines TBV stehen einige Proteine als Impfstoffkandidaten zur Auswahl (Saul, 2007). Darunter fallen unter anderem zwei Mitglieder der 6-Cystein-Motiv-Familie, *Pfs230* und *Pfs48/45* (Renner *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Quakyi *et al.*, 1987; Kocken *et al.*, 1993; Williamson *et al.*, 1993; Williamson *et al.*, 1995; Eksi *et al.*, 2006; Outchkourov *et al.*, 2008) und die EGF(*epidermal growth factor*)-Domäne-enthaltenden Antigene *Pfs25* und *Pfs28* (Vermeulen *et al.*, 1985; Vermeulen *et al.*, 1986; Kaslow *et al.*, 1988; Duffy & Kaslow, 1997; Wu *et al.*, 2008). Mitglieder der *PfCCp*-Proteinfamilie (Pradel *et al.*, 2004; 2006; Scholz *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2009) sowie der orthologen Proteinfamilie *PbLAP* (Claudianos *et al.*, 2002; Dessens *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2004; Raine *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 2008) werden ebenfalls als Kandidaten für TBV gehandelt.

Transmissionsblockierende Medikamente müssten wie die inhibitorisch wirkenden Antikörper der TBV aus dem menschlichen Wirt mit der Blutmahlzeit der Stechmücke aufgenommen werden. Im Mitteldarm der Mücke würden sie ihre inhibitorische Wirkung entfalten und die Sexualstadien des Parasiten angreifen, um den Lebenszyklus des Parasiten zu unterbrechen. Der Einsatz von Antimalariamitteln mit zusätzlicher transmissionsblockierender Aktivität neben der Reduktion der Krankheitssymptome ist besonders in Gegenden mit sehr hohem Malariaübertragungsrisiko essentiell (Fidock *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2007). Bisher konnte nur für ein *Artemisinin*-Derivat in Kombination mit Primaquin und Sulphadoxin-Pyrimethamin eine transmissionsblockierende Wirkung gezeigt werden (Fidock *et al.*, 2004; Shekalaghe *et al.*, 2007). Für Atovaquon konnte ein inhibierender Effekt auf die Ookinetenentwicklung und die Anzahl der gebildeten Oozysten nachgewiesen werden, allerdings übte die Substanz keine Wirkung auf die Anzahl der Sporozoitien im Thorax und in den Speicheldrüsen der Stechmücke aus (Fowler *et al.*, 1995).

Erst kürzlich konnte eine Studie die transmissionsblockierende Aktivität der DNA-bindenden Substanz Centanamycin im Nagermalaria-Modell belegen (Yanow *et al.*, 2008). Dabei übte Centanamycin eine Wirkung auf die Oozystenmorphologie aus und reduzierte die Anzahl der gebildeten Sporozoiten in der Stechmücke um über 99 %.

Um die Entwicklung von TBM weiter voranzutreiben, ist die Erforschung der Sexualphase von *Plasmodium* und dabei stattfindenden molekularen Befruchtungsprozessen essentiell. Bisher ist wenig bekannt über in der Sexualentwicklung von *Plasmodium* involvierte Proteasen, welche exzellente Angriffsziele für die Entwicklung neuer Medikamente darstellen (McKerrow *et al.*, 1993; Rosenthal, 1998; Fidock *et al.*, 2008). Wu *et al.* konnten 92 putative Proteasen dem Genom von *P. falciparum* zuordnen, von denen nur ein Bruchteil charakterisiert worden und eine Funktion postuliert worden war (2003).

4.1.1 Eine Zuteilung möglicher Wirkungsweisen von an der Sexualentwicklung von *P. falciparum* beteiligten Proteasen verschiedener Kategorien und das Potential von Studien unter Einsatz von Protease-Inhibitoren

Die Exflagellation der Mikrogametozyten ist eine essentielle Voraussetzung für die im Stechmückendarm stattfindende Fertilisation von *P. falciparum*. Durch die Identifizierung von Proteasen die dabei eine Rolle spielen, können essentielle molekulare Prozesse während der Sexualentwicklung des Malariaerregers aufgedeckt werden. Eine spezifische Inhibition dabei involvierter Proteasen würde zu einer Unterbrechung des Parasitenlebenszyklus führen und eine weitere Verbreitung des Erregers unterbinden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Protease-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation untersucht, um die Beteiligung von Proteasen an der Sexualentwicklung von *P. falciparum* zu beleuchten. Proteasen werden klassischerweise abhängig von ihrer katalytischen Triade und ihrem Wirkungsmechanismus in folgende Kategorien eingeteilt: in Cysteinproteasen, Serinproteasen, Metalloproteasen und in Aspartatproteasen. Kürzlich wurde diese Einteilung durch zwei weitere Kategorien erweitert, die Glutamat- und Threoninproteasen (Rawlings *et al.*, 2008). Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von Inhibitoren, die Vertreter der Kategorien Cysteinproteasen, Serinproteasen, Metalloproteasen und Aspartatproteasen hemmen. Es konnte gezeigt werden, dass Proteasen verschiedener Kategorien an der Exflagellation der männlichen Gameten beteiligt sind (Rupp *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte die intrazelluläre Lokalisation des Cysteinproteasen- und Falcipain-hemmenden Inhibitors bADA in den asexuellen Parasitenstadien und den Sexualstadien detailliert gezeigt werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse über den Einfluss der Protease-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation wurden durch von Frau cand. biol. R. Bosse und Frau Dr. G.

Pradel durchgeführte Experimente vervollständigt. Dies umfasste die Analyse des Einflusses ausgewählter Inhibitoren auf die Gametozytenaktivierung und die Mikrogametenbildung mittels Immunfluoreszenzstudien (Bosse, 2008; Rupp *et al.*, 2008). Die Untersuchung des Einflusses der Inhibitoren auf den Parasitenausbruch und die Parasitenmorphologie mittels elektronenmikroskopischer Analyse und der Anwendung von Immunfluoreszenzstudien war und ist weiterhin Gegenstand der Forschung des Labors von Frau PD Dr. G. Pradel.

4.1.1.1 Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren

Unter den in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren, die auf Cystein- und Serinproteasen abzielen, hemmten TLCK und TPCK die Exflagellation vollständig, PMSF hemmte die Exflagellation mit Vorinkubation vollständig, und die Inhibitoren Antipain und Leupeptin zeigten keine Wirkung auf die Exflagellation.

TLCK und TPCK wurden ursprünglich als Inhibitoren für Serinproteasen entwickelt (Schoellmann & Shaw, 1963; Shaw *et al.*, 1965), wobei mittlerweile bekannt ist, dass sie ein breites Spektrum an Serin- sowie Cysteinproteasen inhibieren (Powers *et al.*, 2002; Rawlings *et al.*, 2008). Darunter fallen auch die Cysteinprotease Papain (Whitaker & Perez-Villasenor, 1968) sowie die Serinprotease Subtilisin (Poulos *et al.*, 1976). Sulfonyl-Fluoride wurden erstmals von Fahrney & Gold als Serinproteasen-Hemmer beschrieben (1963), zu denen ebenfalls PMSF zählt. PMSF inhibiert hauptsächlich Serinproteasen mit Ausnahme einiger Cysteinproteasen (Powers *et al.*, 2002; Rawlings *et al.*, 2008) wie z.B. Papain (Whitaker & Perez-Villasenor, 1968). Die Tatsache, dass die Mikrogametozytenexflagellation von den Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren TLCK, TPCK und PMSF aber nicht von den Cysteinprotease-Inhibitoren E-64 und E-64d inhibiert wurde (vergleiche weiter unten), lässt den Rückschluss zu, dass Serinproteasen maßgeblich durch die erstgenannten Inhibitoren blockiert worden sind. Weiterhin liegt es in Anbetracht der Inhibition der Exflagellation durch die Falcipain-hemmenden Inhibitoren bADA und RV112D nahe davon auszugehen, dass zusätzlich Falcipain-ähnliche Proteasen durch TLCK, TPCK und PMSF inhibiert wurden (vergleiche weiter unten). Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass Falcipaine Papain-ähnliche Cysteinproteasen sind (Rosenthal, 2004), die in das Wirkungsspektrum aller drei Inhibitoren fallen.

TLCK und TPCK inaktivieren Serinproteasen durch die Alkylierung des Histidins, PMSF dagegen durch eine Sulfonylierung des Hydroxylrestes des Serins im aktiven Zentrum der Zielprotease (Powers *et al.*, 2002). Diese verschiedenen Reaktionsmechanismen könnten darauf hinweisen, dass zwei unterschiedliche (oder mehr) Serinproteasen von den Inhibitoren in den Experimenten gehemmt werden und an der Mikrogametozytenexflagellation beteiligt sind. Unterstützend für diese Hypothese lässt sich

Diskussion

anführen, dass TLCK Trypsin-ähnliche Serinproteasen hemmt (Shaw *et al.*, 1965) aber nicht Chymotrypsin-ähnliche, während sich TPCK als Inhibitor für Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen (Schoellmann & Shaw, 1963) aber nicht Trypsin-ähnliche Serinproteasen auszeichnet. Dies könnte ebenfalls auf eine Beteiligung von zwei (oder mehr) Serinproteasen an der Mikrogametozytenexflagellation hinweisen. Es konnte weiterhin belegt werden, dass TLCK die Gametozytenaktivierung signifikant inhibiert sowie dass TLCK, TPCK und PMSF die Anzahl der gebildeten Mikrogameten signifikant reduzieren (Bosse, 2008; Rupp *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse lassen sich mit der inhibitorischen Aktivität der genannten Inhibitoren auf die Exflagellation der männlichen Gameten in Übereinstimmung interpretieren. Der Einfluss der Inhibitoren auf die Exflagellation der männlichen Gameten manifestiert sich somit ebenfalls eindeutig in der bestimmten Anzahl der gebildeten Mikrogameten. Den inhibierten Zielproteasen wird eine Rolle in der Mikrogametenbildung zugesprochen (Bosse, 2008; Rupp *et al.*, 2008). Zusätzlich sind Serin- und/oder Cysteinproteasen an der Gametozytenaktivierung beteiligt.

Eine an *P. berghei* durchgeführte Studie die den Einfluss von TLCK, TPCK und PMSF auf die Mikrogametozytenexflagellation untersuchte, bestätigt für TLCK und TPCK die Inhibition dieses biologischen Prozesses (Torres *et al.*, 2005). Die Exflagellation wurde allerdings nicht durch den Inhibitor PMSF blockiert. Ein wichtiger Unterschied im experimentellen Aufbau der genannten Studie zu der in dieser Arbeit angewandten Methodik ist, dass der Einfluss des Inhibitors in der voran genannten Studie nicht zusätzlich mit einer 15-minütigen Vorinkubation der Gametozyten getestet worden ist. Der Einfluss aller Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation der hier dargestellten Studie wurde mit und ohne Vorinkubation untersucht, wobei PMSF nur mit einer Vorinkubation der Gametozyten eine inhibitorische Aktivität in der Mikrogametozytenexflagellation aufwies. Dies erklärt, warum Torres *et al.* keine inhibitorische Aktivität von PMSF feststellen konnten. Die Autoren bedienten sich zusätzlich der Anwendung von L-Cystein als kompetitiven Hemmstoffes, dessen Einfluss zusammen mit den Inhibitoren TLCK und TPCK auf die Exflagellation getestet wurde. Die blockierende Aktivität der Protease-Inhibitoren wurde durch L-Cystein beinahe komplett aufgehoben, was den Rückschluss von Torres *et al.* erlaubte, dass Cysteinproteasen an der Mikrogametozytenexflagellation maßgeblich beteiligt sind. Die hier dargestellte Studie erweitert das Wirkungsspektrum von TLCK und TPCK in *P. falciparum* insofern, dass zu den inhibierten Cysteinproteasen ebenso Serinproteasen gehören könnten. Nicht auszuschließen ist, dass durch TLCK und TPCK zusätzlich Proteinkinasen inhibiert werden, die in der Gametogenese von *P. falciparum* involviert sind (Übersichtsartikel Doerig *et al.*, 2008). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass TLCK und TPCK eine starke inhibitorische Aktivität auf die Proteinkinase C ausüben (Solomon *et al.*, 1985). Die in der männlichen Gametogenese beteiligten Proteinkinasen wie die mitogenaktivierte

Proteinkinase (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK; Khan *et al.*, 2005; Rangarajan *et al.*, 2005; Tewari *et al.*, 2005) sowie die kalziumabhängigen Proteinkinasen CDPK4 (*calcium dependent protein kinase 4*; Billker *et al.*, 2004) und PKG (*cGMP-dependent protein kinase*; McRobert *et al.*, 2008) könnten ebenfalls Zielenzyme für TLCK und TPCK darstellen und von ihnen inhibiert werden. Ebenso diskutiert werden muss an dieser Stelle, dass sich Chloromethylketone wie TLCK und TPCK einerseits durch eine hohe Reaktivität, aber andererseits auch durch eine erniedrigte Selektivität auszeichnen (Otto & Schirmeister, 1997). Somit darf nicht außer Acht gelassen werden, dass TLCK und TPCK ebenso mit schwefelgruppenenthaltenden Molekülen wie Glutathion reagieren können (Shaw, 1990). Glutathion ist ein als Antioxidans wirkendes Peptid, welches unter anderem in Detoxifizierungsreaktionen eine wichtige Rolle spielt, die von der Glutathion-S-Transferase (GST) katalysiert werden. Für *P. falciparum* wurde ebenfalls das Vorkommen einer GST beschrieben (Harwaldt *et al.*, 2002; Liebau *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass TLCK und TPCK im Laufe der Gametogenese wichtige Detoxifizierungsreaktionen hemmen, die zusätzlich zu einer reduzierten Mikrogametozyten-exflagellation führen würden.

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen an mit TLCK, TPCK und PMSF behandelten aktivierten Stadium-V-Gametozyten ergaben, dass der Ausbruch aus der Wirtszelle von den Inhibitoren behindert wird. Eine Studie lieferte Hinweise darauf, dass mit TLCK und TPCK behandelte aktivierte Gametozyten nicht in der Lage sind, aus der parasitophoren Vakuolenmembran auszutreten (Bosse, 2008), während dagegen andere Arbeiten Beweise dafür belegen konnten, dass TLCK, TPCK und PMSF die Ruptur der Erythrozytenmembran verhindern (Frau L. Sologub und Frau PD Dr. G. Pradel, unveröffentlichte Ergebnisse). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TLCK keinen Einfluss auf die Axonembildung in Mikrogametozyten ausübt. Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung von Antiseren gegen *Pfs16* als spezifisches Protein der parasitophoren Vakuolenmembran (Baker *et al.*, 1994; Lanfrancotti *et al.*, 2007) sowie gegen Band 3 als integrales Protein der Erythrozytenmembran (Kopito & Lodish, 1985) unterstützten das Ergebnis, dass TLCK und TPCK die Ruptur der Wirtszellmembran und nicht der PVM inhibieren (Frau L. Sologub und Frau PD Dr. G. Pradel, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Hypothese, dass PMSF an der Ruptur der Wirtszellmembran beteiligt ist, konnte allerdings von diesen Arbeiten nicht bestätigt werden. Ponzi *et al.* postulierten, dass die Destabilisierung der PVM unter Beteiligung des Proteins *Pbpeg3* eine essentielle Voraussetzung für den Ausbruch männlicher und weiblicher aktivierter Gametozyten aus der Wirtszelle darstellt, und der Erythrozytenruptur vorausgeht (2009). Untersuchungen hinsichtlich des Parasitenausbruchs von Merozoiten aus Erythrozyten oder Hepatozyten lieferten ebenfalls Hinweise darauf, dass die PVM-Ruptur vor der Ruptur der

Diskussion

Wirtszellmembran erfolgt (Wickham *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2006; Sturm & Heussler, 2007). Demnach ist es unwahrscheinlich, dass aktivierte Gametozyten noch mit der PVM umgeben vorliegen während die Erythrozytenmembran bereits degradiert ist. Die zum Teil konträren Ergebnisse der TEM-Untersuchungen lassen sich dahingehend zusammenfassend interpretieren, dass TLCK und TPCK mit großer Wahrscheinlichkeit an dem Parasitenausbruch beteiligte Serinproteasen und/oder Falcipain-ähnliche Proteasen hemmen. An der Ruptur der Erythrozytenmembran beteiligte Proteasen sind möglicherweise die inhibitorischen Zielproteasen. Dies würde im Falle der Mikrogametozyten in einer reduzierten Exflagellationsfähigkeit sowie einer reduzierten Anzahl der freien Mikrogameten resultieren. Die Analyse von Aktinomyzeten-Kulturfiltraten führte zur Entdeckung der Peptidyl-Aldehyde Leupeptin (Aoyagi *et al.*, 1969) und Antipain (Suda *et al.*, 1972; Umezawa *et al.*, 1972), welche als Serin- und Cysteinprotease-Inhibitoren eingesetzt werden (Otto & Schirmeister, 1997; Rawlings *et al.*, 2008). Antipain zeigt ebenso gegenüber der Cysteinprotease Papain inhibitorische Aktivität (Rawlings *et al.*, 2008). Einige der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren können auch als peptidähnlich (peptidomimetisch) bezeichnet werden. Dazu gehören Antipain, Leupeptin, E-64, E-64d, RV112D und Pepstatin A. Die genannten Inhibitoren weisen mit Ausnahme von RV112D alle keine inhibitorische Aktivität in der Mikrogametozytenexflagellation auf (eine nähere Betrachtung der Wirkung der einzelnen Inhibitoren erfolgt weiter unten). Torres *et al.* konnten in *P. berghei* ebenfalls keinen inhibitorischen Effekt von Leupeptin auf die Exflagellation feststellen (2005). Eine Erklärung dafür könnte die Annahme liefern, dass peptidähnliche Substanzen von *P. falciparum* über den *Nutrient Permeation Pathway* (NPP) aufgenommen werden, wie beschrieben für Pepstatin A (Saliba & Kirk, 1998). Diese Art der Nährstoffaufnahme erfolgt über ein Netzwerk von tubovesikulären Membranausläufern (TVM) der parasitophoren Membran (Aikawa, 1971; Behari & Haldar, 1994), welches sich vom intrazellulären Parasiten bis zur Wirtszellperipherie erstreckt und nur in parasitierten Erythrozyten vorkommt (Lauer *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass andere peptidähnliche Substanzen ebenso in dieser Weise Zugang zum Parasiten erhalten (Saliba & Kirk, 1998). Gametozyten zeichnen sich durch eine im Vergleich zum Trophozoiten verlangsamte Nährstoffaufnahme und einen niedrigen Metabolismus aus (Lang-Unnasch & Murphy, 1998). Dies würde bedeuten, dass peptidomimetische Substanzen wie Leupeptin und Antipain weniger Zugang zu Gametozyten haben, welche in dieser Studie auch mit Vorinkubation keine Wirkung auf die Mikrogametozytenexflagellation ausübten. Eine Studie die die asexuelle Parasitenentwicklung von *P. knowlesi* unter dem Einfluss verschiedener Protease-Inhibitoren untersuchte, konnte die Blockierung der Erythrozytenruptur durch Leupeptin belegen (Hadley *et al.*, 1983). Dieses Ergebnis bestätigen Untersuchungen an *P. falciparum*, bei denen Leupeptin (Debrabant & Delplace, 1989) bzw. Leupeptin in Kombination mit Antipain

Diskussion

(Wickham *et al.*, 2003) die Merozoitenfreilassung und dabei involvierte proteolytische Prozessierungen inhibierte. Die Wirkung von Leupeptin könnte darauf zurückzuführen sein, dass Trophozoiten das metabolisch aktivste Parasitenstadium darstellen, und Leupeptin im Laufe deren Entwicklung in größeren Konzentrationen aufgenommen werden kann. Dluzewski *et al.* konnten einen toxischen Effekt von Leupeptin auf das Trophozoitenwachstum belegen, bei dem sich die Parasiten durch eine vergrößerte Nahrungsvakuole auszeichnen (1986). Ob ähnliche Proteasen in der Wirtszellruptur von Schizonten-infizierten und Gametozyten-infizierten Erythrozyten beteiligt sind, bleibt zu untersuchen und stellt eine interessante Fragestellung dar. Um eine eindeutige Aussage über die Wirkung von Leupeptin und Antipain auf die Sexualstadien treffen zu können, müssten Experimente angeschlossen werden, die den Zugang der Substanzen zum Parasiten verifizieren bzw. erleichtern könnten. Dies könnte beispielsweise über eine Vorinkubation der Gametozyten mit 0,001 % Saponin geschehen wie in Eksi *et al.* beschrieben (2007). Würde eine Inhibition von Antipain und Leupeptin in diesen Experimenten verzeichnet werden, könnten Studien angeschlossen werden, die den inhibitorischen Effekt der Protease-Inhibitoren unter Zugabe spezifischer NPP-Inhibitoren wie 5-Nitro-2-(3-phenyl-propylamino)benzoesäure (NPPB), Furosemid oder Niflummat (Kirk *et al.*, 1994) untersuchen. Dies würde erstens den Beweis dafür liefern, dass peptidähnliche Substanzen im Allgemeinen über den NPP-Transportweg Zugang zum Parasiten erhalten, und zweitens den Einfluss der Protease-Inhibitoren Leupeptin und Antipain auf die Mikrogametozytenexflagellation klären.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass beim Austritt von Blutstadienmerozoiten, Leberstadienmerozoiten und beim Austritt von Gametozyten aus der Wirtszelle derselbe Mechanismus zugrunde liegt (Blackman, 2008). Dabei könnten vor allem Proteasen durch die Hydrolyse von Zytoskelettkomponenten für die Destabilisierung der unterschiedlichen den intrazellulären Parasiten umgebenden Membranen verantwortlich sein. Alleine die kraftvolle Bewegung intrazellulärer Mikrogameten reicht zumindest nicht aus, um die Ruptur der Wirtszellmembran herbeizuführen (Ponzi *et al.*, 2009). Einige Studien konnten die Beteiligung von Proteasen am Wirtszellausbruch nachweisen. Dazu gehören PfSub1 und dessen Beteiligung am Merozoitenaustritt aus den Erythrozyten (Koussis *et al.*, 2009), ECP1 und dessen Beteiligung am Sporozoitenaustritt aus der Oozyste (Aly & Matuschewski, 2005) sowie die Beteiligung der SERA-Proteasen beim Austritt von Merozoiten aus Erythrozyten (Yeoh *et al.*, 2007) sowie Hepatozyten (Schmidt-Christensen *et al.*, 2008).

Die hier gezeigten Daten weisen im Zusammenhang mit den von Frau PD Dr. G. Pradel und Frau L. Sologub durchgeführten TEM-Untersuchungen ebenfalls auf eine Beteiligung von Proteasen an der Destabilisierung der Erythrozytenmembran im Zuge des Gametozytenausbruchs hin.

4.1.1.2 Cysteinprotease-Inhibitoren

Unter den Inhibitoren der Kategorie Cysteinproteasen zeigten die Falcipaine-hemmenden Inhibitoren bADA und RV112D eine Wirkung auf die Exflagellation. Beide inhibierten die Mikrogametozytenexflagellation mit Vorinkubation nahezu vollständig, während die Inhibitoren E-64 und dessen membranpermeable Variante E-64d auch mit Vorinkubation keine Wirkung auf die Exflagellation ausübten.

Kürzlich generierte Daten wiesen im Unterschied dazu eine Hemmung von E-64d auf die Mikrogametozytenexflagellation auf (Frau L. Sologub und Frau PD Dr. G. Pradel, unveröffentlichte Ergebnisse). Das Ergebnis, dass E-64d keinen Einfluss auf diesen Prozess ausübt, wird neben den in dieser Arbeit generierten Daten von einer Studie bestätigt, die nach einer einstündigen Inkubation der Gametozyten mit E-64d in einer Konzentration von 100 μ M keine veränderte Exflagellation der männlichen Gameten feststellen konnte (Eksi *et al.*, 2007). Zusätzlich dazu wurden Untersuchungen des Einflusses des Cysteinprotease-Inhibitors *N*-acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal (ALLN) auf die Mikrogametozytenexflagellation veröffentlicht, die keine Wirkung des Inhibitors auf diesen biologischen Prozess belegen konnten (Czesny *et al.*, 2009). Die Daten der hier dargestellten Ergebnisse werden somit unter Vorbehalt dahingehend interpretiert, dass der Inhibitor E-64d keinen Einfluss auf die Mikrogametozytenexflagellation ausübt.

Die Protease-Inhibitoren E-64 (Hanada *et al.*, 1978) und sein membranpermeables Analogon E-64d (Tamai *et al.*, 1986) zeigen inhibitorische Aktivität gegenüber einer Vielzahl bekannter Cysteinproteasen (Rawlings *et al.*, 2008). Über E-64 ist bekannt, dass er zwar inhibitorische Aktivität gegenüber der Cysteinprotease Papain (Rawlings *et al.*, 2008), aber nicht Falcipain-1 zeigt (Goh *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass E-64 und E-64d als Cysteinprotease-Inhibitoren auch nach Vorinkubation der Parasiten in der vorliegenden Arbeit keine Wirkung auf den Prozess der Mikrogametozytenexflagellation zeigen, liefert einen wichtigen Hinweis auf die Art der beteiligten Proteasen. Die Wirkung der Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren TLCK, TPCK und PMSF ist daher vornehmlich auf die Hemmung von Serinproteasen zurückführbar und weniger auf die Hemmung beteiligter Cysteinproteasen mit Ausnahme der Falcipaine bzw. Falcipain-ähnlichen Proteasen. Es konnte dennoch gezeigt werden, dass Cysteinproteasen eine wichtige Rolle in der Gametogenese und Sporogonie einnehmen. Die Inkubation von Gametozyten mit E-64d resultierte einerseits in der Inhibition der proteolytischen Prozessierung des gametentypischen Oberflächenproteins Pfs230 (Brooks & Williamson, 2000) und andererseits in der Reduktion der Oozystenproduktion (Eksi *et al.*, 2007). Die inhibitorische Wirkung von E-64 konnte weiterhin auf das asexuelle Parasitenwachstum bewiesen werden (Salmon *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 2003; Soni *et al.*,

Diskussion

2005). E-64 blockierte dabei Proteasen, die in der Ruptur der parasitophoren Vakuolenmembran vor der Freilassung der Merozoiten involviert sind.

Das Genom von *P. falciparum* kodiert insgesamt für vier Mitglieder der Falcipaine, welche einer Papain-ähnlichen Cysteinproteasen-Familie angehören, Falcipain-1, -2 (oder -2A), -2' (oder -2B) und -3 (Rosenthal, 2004). Die Autoren aus Goh *et al.* postulieren, dass Falcipain-1 deutlich abweichende biochemische Eigenschaften im Gegensatz zu den übrigen Mitgliedern der Falcipain-Familie besitzt (2005). Unter Verwendung des Falcipain-1-Inhibitors YA29 wiesen Greenbaum *et al.* Falcipain-1 eine Rolle bei der Wirtszellinvasion von Merozoiten zu (2002). Zu einem anderen Ergebnis kommen Studien, in denen die Analyse von Gen-*knockout*-Parasiten belegt, dass Falcipain-1 keine Bedeutung in der asexuellen Parasitenvermehrung (Eksi *et al.*, 2004; Sijwali *et al.*, 2004), der Gametozytogenese oder der Gametogenese, aber dafür in der Oozystenentwicklung zugeschrieben werden kann (Eksi *et al.*, 2004). Studien an Falcipain-1-*knockout*-Parasiten bewiesen deren normale Entwicklung im Laufe der Gametozytogenese und dass die männlichen Gameten keine veränderte Exflagellationsfähigkeit besitzen (Eksi *et al.*, 2004). Falcipain-2 und -3 sind am Hämoglobinabbau in der Nahrungsvakuole des Parasiten beteiligt (Shenai *et al.*, 2000; Sijwali *et al.*, 2001; Sijwali & Rosenthal, 2004; Subramanian *et al.*, 2009). Falcipain-2 wird zusätzlich eine Rolle im Merozoitenausbruch aus dem Erythrozyten zugewiesen (Hanspal *et al.*, 2002; Dhawan *et al.*, 2003). Die katalytische Domäne von Falcipain-2' ähnelt zu 99 % der von Falcipain-2, und diese Protease scheint ebenso am Prozess des Parasitenausbruchs aus der Wirtszelle (Jeong *et al.*, 2006) wie auch an der Hämoglobinhydrolyse beteiligt zu sein (Singh *et al.*, 2006). Eksi *et al.* konnten zeigen, dass Falcipain-2 und -2' nur in asexuellen Parasitenstadien sowie in jungen Gametozyten bis Stadium II exprimiert werden, während Falcipain-3 während der gesamten Gametozytogenese bis Stadium-V-Gametozyten lokalisierbar war (2007). Für Falcipain-3 wurde unter anderem deswegen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von der Zygote zur Oozyste zugesprochen (Eksi *et al.*, 2007).

Der Inhibitor RV112D ist ein Derivat der N-acylierten Aziridin-2,3-dicarboxysäure und wurde aus 88 synthetischen Cysteinprotease-Inhibitoren aufgrund seiner starken inhibitorischen Aktivität ausgewählt (Verbindung 34b; Schulz *et al.*, 2007). RV112D zeigte antiplasmodiale Aktivität sowie eine Hemmung von rekombinant hergestelltem Falcipain-2 und -3. Ob RV112D ausschließlich Falcipain-2 und -3 hemmt, wurde in dieser Studie nicht untersucht, was den Rückschluss zulässt, dass RV112D neben Falcipainen auch Falcipain-ähnliche Cysteinproteasen in *P. falciparum* inhibieren könnte. RV112D zeigte ebenfalls eine signifikante inhibitorische Aktivität in Bezug auf die Gametozytenaktivierung und die Mikrogametenbildung (Bosse, 2008; Rupp *et al.*, 2008). Die Gametozytenaktivierung ist eine essentielle Voraussetzung für die nachfolgend ablaufenden Prozesse wie

Diskussion

Mikrogametozytenexflagellation und Mikrogametenbildung im Laufe der Gametogenese. Möglicherweise ist die Wirkung von RV112D auf eine Inhibierung von Falcipain-3 oder anderer, unbekannter Falcipain-ähnlicher Cysteinproteasen zurückzuführen, und weniger auf eine Hemmung von Falcipain-1, -2, und -2'. Zur Verifizierung dieser Hypothese könnten unter anderem Experimente dienen, die den Einfluss von neu entwickelten spezifisch wirkenden Falcipain-2-Inhibitoren (Ettari *et al.*, 2009) untersuchen würden.

Der Cysteinprotease-Inhibitor bADA ist ein biotinyliertes Dibenzyl-aziridin-2,3-dicarboxylat, dessen antiplasmodiale Aktivität bereits bewiesen wurde (Verbindung 3a, Gelhaus *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass bADA an nativem Falcipain-2 und -3 asexueller Parasitenstadien bindet sowie rekombinantes Falcipain-2 inhibiert. Gelhaus *et al.* konnten ebenso zeigen, dass bADA putative Zielproteasen in asexuellen Parasiten inhibiert, die in die Ruptur der Wirtszellmembran involviert sind (2005). Der Ausbruch der Parasiten aus der PVM wird von bADA hingegen nicht beeinträchtigt. Immunfluoreszenzstudien an aktivierten Gametozyten unter Verwendung von Antiseren gegen gegen *Pfs16* als spezifisches Protein der parasitophoren Vakuolenmembran (Baker *et al.*, 1994; Lanfrancotti *et al.*, 2007) sowie gegen Band 3 als integrales Protein der Erythrozytenmembran (Kopito & Lodish, 1985) unterstützten das Ergebnis, dass bADA die Ruptur der PVM nicht inhibiert (Frau PD Dr. G. Pradel, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Hemmung der Wirtszellruptur konnte mit dieser Technik hingegen noch nicht eindeutig belegt werden. TEM-Analysen zeigten jedoch, dass bADA teilweise die Ruptur der die Gameten umgebenden Erythrozytenmembran inhibiert. Weiterhin konnten Immunfluoreszenzstudien zeigen, dass bADA zwar nicht die Gametozytenaktivierung beeinflusst, aber die Anzahl der gebildeten Mikrogameten signifikant reduziert (Bosse, 2008). Die Annahme liegt nahe, dass bADA in asexuellen Parasitenstadien ähnliche oder gleiche Zielproteasen inhibiert wie in den Sexualstadien. Die inhibierte Exflagellationsfähigkeit der Mikrogametozyten wäre somit direkt auf gehemmte Proteasen zurückzuführen, die den Parasitenausbruch aus der Wirtszellmembran vermitteln. Dies würde ebenfalls die unter dem Einfluss von bADA reduzierte Anzahl der gebildeten Mikrogameten erklären. Möglicherweise stellen Falcipain-ähnliche Cysteinproteasen und Falcipain-3 die inhibierten und am Parasitenausbruch beteiligten Zielproteasen von bADA und RV112D dar, denen eine Rolle in der Mikrogametenbildung zugesprochen wird (Bosse, 2008; Rupp *et al.*, 2008). Da im Gegensatz zu bADA für RV112D keine Aktivität gegen den Parasitenausbruch gezeigt werden konnte, ist es wahrscheinlich anzunehmen, dass mehr als eine putativen Zielprotease an diesem Prozess beteiligt ist.

In dieser Arbeit konnte weiterhin eine homogene intrazelluläre Verteilung von bADA in den asexuellen Parasitenstadien sowie den Sexualstadien mittels Affinitäts-Markierungen, wie beschrieben in Gelhaus *et al.*, 2005, bewiesen werden. Die Markierung von bADA und daran möglichen gekoppelten Zielproteasen wurde detailliert für Trophozoiten, Schizonten,

Diskussion

Stadium-I-V-Gametozyten und Makrogameten gezeigt. Mikrogameten wiesen dagegen keine Markierung des Biotin-gekoppelten Inhibitors auf. Die Hervorhebung des Inhibitors durch die Verwendung eines Cy3-Konjugats zeigte verglichen mit den stadienspezifischen Kontrollmarkierungen ein deutlich unterscheidbares Muster. Antiseren gegen stadienspezifische Oberflächenproteine wie *PfMSP-1*, *Pfs230*, und ein anti- α -Tubulin-Antikörper wurden als Kontrolle in entsprechenden Immunmarkierungen eingesetzt. *PfMSP-1* ist über einen GPI-Anker mit der parasitären Oberfläche verbunden (Gerold *et al.*, 1996), während *Pfs230* über das GPI-gekoppelte Protein *Pf48/45* mit der Plasmamembran der Parasiten assoziiert vorliegt (Kumar, 1987; Kumar & Wize, 1992). Die Verwendung des anti- α -Tubulin-Antikörpers resultiert unter anderem in der Markierung des längsassozierten Mikrotubulipaares, das eng mit der parasitären Plasmamembran assoziiert vorliegt (Pellikularkomplex). Die Kontrollmarkierungen hoben zwar einerseits ebenfalls die gesamte parasitäre Zelloberfläche hervor, allerdings wurde die Markierung an den Rändern deutlich stärker. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die verwendeten Antiseren die Oberfläche bzw. mit der Oberfläche der Parasiten assoziierte Komponenten detektiert. Die Markierung von bADA in Trophozoiten, Schizonten, Stadium-I-V-Gametozyten und Makrogameten wies ein homogen verteiltes Muster über den gesamten Parasiten im Gegensatz zu den genannten Kontrollmarkierungen auf. Dies deutet auf eine intrazelluläre Verteilung des Inhibitors mit möglichen daran gebundenen Zielproteasen hin. Eine Ausnahme bildet dabei die Nahrungsvakuole, die als zentrale parasitäre Struktur angereichertes Hämozoin beinhaltet. Dies könnte entweder darauf hindeuten, dass der Inhibitor im parasitären Zytosol akkumuliert vorliegt und nicht in die Nahrungsvakuole eindringen kann, oder dass die Cy3-Fluoreszenz durch das Pigment der Nahrungsvakuole hindurch nicht detektierbar war. Gelhaus *et al.* konnten im Gegensatz dazu die Markierung von bADA in Trophozoiten in der Nahrungsvakuole und im Erythrozytenzytosol nachweisen (2005). In Schizonten wurde bADA ausschließlich in der Nahrungsvakuole detektiert. bADA-behandelte Parasiten zeichneten sich zudem durch eine vergrößerte Nahrungsvakuole aus, was die Autoren dazu veranlasste, den inhibierten Zielproteasen eine Rolle im Hämoglobinabbau zuzusprechen. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse lassen im Gegensatz dazu auf keine Markierung von bADA in der parasitären Nahrungsvakuole oder des Erythrozytenzytosols schließen. Eine Markierung des Erythrozytenzytosols könnte vermutet werden, wenn die putativen Zielproteasen von bADA eine Rolle bei der Wirtszellruptur spielen. Der Transport der direkt an diesem Prozess beteiligten Proteasen in das erythrozytäre Zytoplasma müsste vor dem Parasitenausbruch erfolgen, und würde in einer Markierung dieses Zellkompartiments resultieren. Möglicherweise werden die am parasitären Austritt involvierten Proteasen unter dem Einfluss von bADA indirekt über die Hemmung einer anderen Protease inhibiert. In diesem Zusammenhang ist es denkbar, dass dem

Diskussion

Parasitenausbruch eine Proteasekaskade zugrunde liegt. Die Tatsache, dass Gelhaus *et al.* ebenfalls keine Markierung von bADA im Wirtszellzytosol von Schizonten detektieren konnten (2005) wirkt unterstützend für diese Annahme. Die Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass bADA an Zielproteasen im parasitären Zellzytosol bindet, deren Aktivität im Falle der Mikrogametozyten direkt oder indirekt eine Voraussetzung einer erfolgreichen Exflagellation darstellt. Die Tatsache, dass bADA in Mikrogameten nicht detektiert wurde, könnte wiederum bedeuten, dass an der Mikrogametozytenexflagellation involvierte Proteasen bereits in früheren Zellstadien durch die Anwendung des Inhibitors in ihrer Funktion gehemmt wurden. Da bADA in der hier angewandten Methodik der Affinitäts-Markierung nur mit aktiven Proteasen reagiert (Gelhaus *et al.*, 2005) deutet dies darauf hin, dass Falcipain-1, -2, -2', -3, Falcipain-ähnliche Proteasen im Zytosol von asexuellen Parasitenstadien oder Falcipain-3 und Falcipain-ähnliche Proteasen im Zytosol von Sexualstadien aktiv sein könnten.

Es bleibt unklar, warum die Cysteinprotease-Inhibitoren E-64 und E-64d in den hier dargelegten Untersuchungen keine Wirkung auf die Mikrogametozytenexflagellation ausüben, während die Falcipain-hemmenden Inhibitoren bADA und RV112D eine inhibitorische Aktivität aufweisen. Zudem blockieren E-64 und sein Analogon E-64d Papain-ähnliche Proteasen, zu denen die Falcipaine ebenfalls zählen, mit Ausnahme von Falcipain-1 (Goh *et al.*, 2005; Rawlings *et al.*, 2008). Eine Erklärung dieser Tatsache wäre, dass E-64 und E-64d als peptidomimetische Substanzen schwer Zugang zu Gametozyten erlangen (siehe weiter oben). Um die Aufnahme des ohnehin membranpermeablen Inhibitors E-64d weiter zu erleichtern, bedienten sich Eksi *et al.* der Perforation der äußeren Wirtszellmembran durch Inkubation von Stadium-V-Gametozyten mit 0,001 % Saponin (2007). Dies resultierte in einer verminderten benötigten E-64d-Konzentration im Zusammenhang der proteolytischen Prozessierung von *Pfs230* und führte zur Feststellung, dass die Sicherung des Zugangs zu Gametozyten eine wichtige Komponente bei der Entwicklung transmissionsblockierender Medikamente sein muss. Die Inhibitoren bADA und RV112D könnten strukturell einen Vorteil gegenüber E-64 und E-64d besitzen, was ihre Aufnahme durch Gametozyten betrifft. RV112D gilt zwar auch als peptidomimetisch, stellt allerdings eine Ausnahme in der Reihe dieser Substanzen dar, da er als einziger peptidähnlicher Inhibitor eine Wirkung auf die Mikrogametozytenexflagellation ausübt. Über bADA berichtet Gelhaus *et al.* beispielsweise wie bei der Entwicklung dieses Inhibitors speziell auf Lipidlöslichkeit und Membrandurchlässigkeit geachtet wurde (2004). bADA stellt zudem im Vergleich zu E-64 eine ungeladene Verbindung dar, was die Membrandurchlässigkeit um ein Vielfaches erhöht. Die erschwerte Zugänglichkeit der Gametozyten für extrazelluläre Substanzen erklärt auch die relativ hohen Konzentrationen, in

denen die verwendeten Inhibitoren in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden (25 μ M-1 mM).

Weiterhin lässt sich spekulieren, dass die von bADA und RV112D inhibierten Proteasen im Allgemeinen nicht von E-64 und E-64d gehemmt werden, wie beschrieben in Goh *et al.* für Falcipain-1 (2005). Obwohl Falcipaine und Falcipain-ähnliche Proteasen strukturell Papain-ähnlich sind, könnten dennoch spezifische Aminosäurereste für eine optimale Substratbindung von E-64 und E-64d fehlen. Dies ließe sich unter anderem eindeutig klären, wenn die inhibitorische Aktivität von E-64 und E-64d an rekombinant hergestelltem Falcipain-2 und -3 getestet werden würde, wie beschrieben für die Inhibitoren bADA und RV112D (Gelhaus *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2007).

4.1.1.3 Metalloprotease-Inhibitoren

Die Anwendung von Metalloprotease-Inhibitoren deckte auf, dass der Inhibitor 1,10-Phenanthrolin die Exflagellation der Mikrogametozyten vollständig inhibierte, während der Inhibitor Phosphoramidon keine Wirkung auf diesen Prozess ausübte.

Felber *et al.* beschrieben 1962 die Inhibition einer Metalloprotease durch 1,10-Phenanthrolin. Dieser Metallchelator wirkt vornehmlich, aber nicht ausschließlich, auf Metalloproteasen, die ein Zinkion im aktiven Zentrum besitzen (Rawlings *et al.*, 2008). Metallchelatoren inaktivieren metallhaltige Enzyme entweder durch die Entfernung des Metallions aus dem aktiven Zentrum oder die Bildung einer kovalenten Bindung damit (Auld, 1995). Phosphoramidon wurde aus Aktinomyzeten isoliert und wird als Metalloproteasen-Inhibitor beschrieben, der vornehmlich Thermolysin hemmt (Suda *et al.*, 1973; Rawlings *et al.*, 2008).

Die in dieser Arbeit beschriebene Inhibition der Mikrogametozytenexflagellation durch 1,10-Phenanthrolin weist darauf hin, dass in der männlichen Gametogenese eine oder mehrere Metalloproteasen maßgeblich beteiligt sind. Möglicherweise gehören diese Proteasen zu den zinkhaltigen Enzymen. Dadurch, dass Phosphoramidon keine inhibitorische Aktivität auf den untersuchten Prozess ausübt, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die daran beteiligten Metalloproteasen nicht-Thermolysin-ähnlich sind. Eine weitere wichtige Aussage liefert die Tatsache, dass 1,10-Phenanthrolin weder die Gametozytenaktivierung inhibiert noch die Anzahl der gebildeten Mikrogameten reduziert (Bosse, 2008; Rupp *et al.*, 2008), obwohl die hier dargestellten Ergebnisse einen deutlichen Einfluss des Inhibitors auf die Mikrogametozytenexflagellation aufzeigen (Rupp *et al.*, 2008). Dies bedeutet, dass den in der Exflagellation der männlichen Gameten involvierten Proteasen eine Bedeutung in der Motilität der Mikrogameten zukommt (Bosse, 2008; Rupp *et al.*, 2008). Übereinstimmend mit dieser Annahme lieferten TEM-Analysen sowie Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung von Antiseren gegen *Pfs16* als spezifisches Protein der parasitophoren Vakuolenmembran

Diskussion

(Baker *et al.*, 1994; Lanfrancotti *et al.*, 2007) sowie gegen Band 3 als integrales Protein der Erythrozytenmembran (Kopito & Lodish, 1985) Beweise für den regulär stattfindenden Ausbruch aktivierter Gametozyten aus der Wirtszelle unter Einfluss von 1,10-Phenanthrolin (Frau L. Sologub und Frau PD Dr. G. Pradel, unveröffentlichte Ergebnisse). Offensichtlich können trotz Inhibitorzugabe männliche Gametozyten aktiviert werden, sich abrunden, aus der Wirtszelle austreten und exflagellieren. In den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten wurde die Bildung der Exflagellationszentren untersucht, deren Anzahl lichtmikroskopisch hauptsächlich über die bewegliche Natur der Mikrogameten festgestellt wurde. Sofern diese nach dem Austritt aus der Wirtszelle oder auch nach dem Ablösen vom Mikrogametozyten immotil vorliegen, würden sie durch die hier angewandte Methodik nicht erkannt werden.

Die Beteiligung von Metalloproteasen an der Gametogenese untersuchten ebenfalls Brooks & Williamson in einer Studie durch die Inkubation von Gametozyten mit 1,10-Phenanthrolin (2000). Dies resultierte in der Inhibition der proteolytischen Prozessierung von Pfs230 und lieferte erste Hinweise für in der Gametogenese von *P. falciparum* involvierte Metalloproteasen. Die Autoren dieser Studie formulierten die Schlussfolgerung, dass 1,10-Phenanthrolin als Metallchelator die Aktivierung der verantwortlichen Proteasen inhibieren könnte. Möglicherweise sind dies dieselben Proteasen, die auch bei der Motilität der Mikrogameten involviert sind und dafür aktiviert werden müssen.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang zu nennen, dass der Inhibitor 1,10-Phenanthrolin als Metallchelator ebenfalls in der Lage ist, andere metallhaltigen Enzyme wie z.B. die Carboanhydrase (Kidani & Hirose, 1977) oder möglicherweise kalziumabhängige Kinasen zu hemmen (vergleiche weiter unten). In *P. falciparum* konnten drei Isozyme der Carboanhydrase identifiziert werden (Reungprapavut *et al.*, 2004). Ob die Inhibierung der Mikrogametozytenexflagellation unter Anwendung von 1,10-Phenanthrolin allerdings auf die Hemmung einer Metalloprotease oder einer Carboanhydrase zurückzuführen ist, ist mit den erzielten Ergebnissen nicht eindeutig belegbar. Aufschluss darüber könnten beispielsweise Studien liefern, die den Einfluss geringer Konzentrationen eines weiteren Metallchelators wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) auf die Exflagellation der Mikrogametozyten untersuchen würden.

Diese Erkenntnisse lassen weiterhin den Rückschluss zu, dass die Wirkung kalziumabhängiger Kinasen, die in der Sexualentwicklung von *Plasmodium* essentiell sind (Übersichtsartikel Doerig *et al.*, 2008), von 1,10-Phenanthrolin nicht blockiert werden. Die Proteinkinase CDPK4 wird von intrazellulären Kalziumionen aktiviert und ist speziell für die Aktivierung männlicher Gametozyten verantwortlich (Billker *et al.*, 2004). Zudem sind das Abrunden aktivierter Gametozyten sowie der Ausbruch aus der Wirtszelle als kalziumabhängige Prozesse beschrieben worden (Tewari *et al.*, 2005), die offensichtlich

nicht von diesem Metalloprotease-Inhibitor blockiert werden. Die von Torres *et al.* durchgeführten Experimente bezüglich des Einflusses von 1,10-Phenanthrolin unter Zugabe verschiedener Metallionen auf die Mikrogametozytenexflagellation von *P. berghei* zeigen auf, dass der blockierende Effekt des Inhibitors nicht auf die Komplexbildung von Kalzium zurückzuführen ist (2005). Unterstützend dafür lässt sich anführen, dass die Affinität von 1,10-Phenanthrolin für Kalziumionen eher gering ist (Salvesen & Nagase, 2001).

4.1.1.4 Aspartatprotease-Inhibitoren

Unter den Inhibitoren der Kategorie der Aspartatproteasen zeigte EPNP einen deutlichen Einfluss auf die Mikrogametozytenexflagellation, während Pepstatin A keine Wirkung darauf ausübte.

Pepstatin A wurde ebenfalls aus Aktinomyzeten-Kulturfiltraten isoliert und wie EPNP auch als Inhibitor für die Aspartatprotease Pepsin beschrieben (Umezawa *et al.*, 1970; Tang, 1971). Beide Inhibitoren hemmen ebenso eine Vielzahl weiterer Aspartatproteasen und werden für die Identifizierung von Proteasen dieser Kategorie eingesetzt (Rawlings *et al.*, 2008).

Die Hemmung der Mikrogametozytenexflagellation durch EPNP lässt auf daran beteiligte Aspartatproteasen schließen. Übereinstimmend mit dieser Annahme konnte gezeigt werden, dass EPNP ebenso die Gametozytenaktivierung und die Mikrogametenbildung signifikant reduziert (Bosse, 2008; Rupp *et al.*, 2008). Die beteiligten Zielproteasen scheinen eine wichtige Rolle, beginnend von der Gametozytenaktivierung bis zur Bildung der Mikrogameten, zu spielen. Weder der Ausbruch des Parasiten aus der PVM noch aus der Wirtszellmembran scheint jedoch von EPNP inhibiert zu werden (Frau L. Sologub und Frau PD Dr. G. Pradel, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies zeigen Immunmarkierungen der PVM und der Wirtszellmembran an aktivierten Gametozytenstadien unter Einfluss von EPNP. Dabei wurden Antiseren gegen Pfs16 als spezifisches Protein der PVM (Baker *et al.*, 1994; Lanfrancotti *et al.*, 2007) sowie gegen Band 3 als integrales Protein der Erythrozytenmembran (Kopito & Lodish, 1985) verwendet. Saliba & Kirk postulierten 1998, dass Pepstatin A als peptidomimetische Substanz über den *Nutrient Permeation Pathway* aufgenommen wird (vergleiche weiter oben). Pepstatin A könnte auf diesem Weg nur deutlich reduziert von den metabolisch verlangsamten Gametozyten aufgenommen werden können. Dies würde eine Erklärung dafür liefern, dass Pepstatin A auch mit Vorinkubation keine inhibitorische Aktivität auf die Mikrogametozytenexflagellation ausübte. Die in dieser Arbeit verwendeten peptidomimetischen Substanzen wiesen mit Ausnahme von RV112D alle keinen inhibitorischen Effekt auf die Mikrogametozytenexflagellation auf. Einen weiteren Hinweis darauf, warum Pepstatin A verglichen mit EPNP keine Wirkung auf an der

Diskussion

Exflagellation beteiligte Aspartatproteasen ausübte, könnte über die Vorinkubation der Gametozyten unter Zugabe von 0,001 % Saponin gemeinsam mit der Substanz erlangt werden. Dies würde zu einer Permeabilisierung der Wirtszellmembran führen und den Zugang der Inhibitoren erleichtern, wie beschrieben in Eksi *et al.* (2007).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Proteasen-Inhibitorstudien auf eine Beteiligung von zwei oder mehr Serinproteasen, Falcipain-3 bzw. Falcipain-ähnlicher Cysteinproteasen, nicht-Thermolysin-ähnlichen Zink-Metalloproteasen und von Aspartatproteasen an dem Prozess der Mikrogametozytenexflagellation hin. Ergebnisse die von Frau Dr. G. Pradel und Frau cand. biol. R. Bosse bezüglich der Gametozytenaktivierung und Mikrogametenbildung erzielt wurden, vervollständigten diese Studie und führten zur Annahme, dass die Mikrogametenbewegung im Prozess der Exflagellation die Beteiligung von Zink-Metalloproteasen benötigt (Bosse, 2008; Rupp *et al.*, 2008). Entsprechende TEM-Untersuchungen die von Frau PD Dr. G. Pradel und Frau L. Sologub durchgeführt wurden unterstützen die Annahme, dass Proteasen maßgeblich an der Wirtszellruptur im Laufe der Gametogenese beteiligt sind. Diesen Ergebnissen zufolge könnten Serinproteasen und/oder Falcipain-ähnliche Proteasen für die Ruptur der Erythrozytenmembran verantwortlich sein. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von bADA lässt den Schluss zu, dass die Zielproteasen dieses Inhibitors im parasitären Zellzytosol von Trophozoiten, Schizonten, Stadium-I-V-Gametozyten und Makrogameten vorliegen. Die Beteiligung der Zielproteasen von bADA am Wirtszellaustritt asexueller Parasiten ist bereits postuliert worden, und kann aufgrund der aufgeführten TEM-Ergebnisse ebenfalls für den Austritt von Sexualstadien angenommen werden.

Dier hier dargestellten inhibitorischen Aktivitäten der Protease-Hemmer laufen aus pharmakologischer Sicht in einem therapeutisch uninteressanten Bereich ab (μM im Gegensatz zu nM). Zusätzlich wirken die verwendeten Inhibitoren zu unspezifisch, um sie als Medikamente in der Malariatherapie einsetzen zu können. Dennoch stellen die in dieser Studie erlangten Ergebnisse wichtige Erkenntnisse dar in Bezug auf die Fragestellung, welche Proteasen eine Rolle in der Sexualentwicklung von *P. falciparum* spielen. Für die Entwicklung eines Medikamentes mit transmissionsblockierender Aktivität ist die Klärung dieses Sachverhalts essentiell. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die *in-vivo*-Zugänglichkeit der Proteasen für mögliche Inhibitoren und Medikamente zu bestimmen. Die in diesem Teilprojekt identifizierte Beteiligung von Proteasen verschiedener Kategorien an der Gametogenese von *P. falciparum* stellt somit eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer Medikamente dar.

4.1.2 Erkenntnisse über ausgewählte sexualstadienspezifische Proteasen

Ein weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit stellte die Untersuchung von ausgewählten Proteasen dar, die in der Sexualentwicklung von *P. falciparum* involviert sein könnten. Aufgrund der von Wu *et al.* identifizierten Proteasen in *P. falciparum* (2003) und publizierten Transkriptom- und Proteomstudien (Florens *et al.*, 2002; Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003) wurden sechs Proteasen zur näheren Charakterisierung ausgewählt. Es konnten erste wichtige Anhaltspunkte über die Proteasen gewonnen werden. Die erzielten Daten können in Hinblick auf die Erforschung der Rolle der Proteasen in der Sexualphase von *P. falciparum* wertvolle Verwendung finden. Eine anschließende Einschätzung ihres Potentials als TBM wäre danach möglich.

4.1.2.1 Die transkriptionelle Aktivität der Proteasengenloci

Für die ausgewählten Proteasen konnte mRNA in gemischten asexuellen Parasitenkulturen sowie im Großteil der untersuchten Sexualstadien Gametozyten, Gameten und Zygoten festgestellt werden. Lediglich für die GPI:Protein Transamidase und Plasmepsin 6 konnte keine mRNA in den Gameten bzw. Zygoten detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen sich in Deckung bringen mit früher publizierten Transkriptomstudien von *P. falciparum*. Für die Proteasen von Interesse Calpain, DPAP2, GPI8, Metacaspase 2, Plasmepsin 6 und PfSub3 wurde unter anderem mRNA in Schizonten als Vertreter der asexuellen Parasitenstadien und in Gametozyten als Vertreter der Sexualstadien nachgewiesen (Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). Spätere Entwicklungsstadien des sexuellen Vermehrungszyklus von *P. falciparum* sind abgesehen von Sporozoiten nicht in diese Analysen mit einbezogen worden. Auffällig ist, dass in der vorliegenden Arbeit für GPI8 mRNA in Gametozyten und Zygoten, aber nicht in Gameten festgestellt werden konnte. Offensichtlich ist das *GPI8*-Gen in Gameten nicht aktiv, nimmt allerdings seine transkriptionelle Aktivität im Zygotenstadium wieder auf. Für Plasmepsin 6 wäre denkbar, dass das Gen für den sexuellen Vermehrungszyklus ab dem Gametenstadium abgeschaltet wird. Dies könnte durch die Analyse des Transkriptoms späterer Retorten- und Ookinetenstadien geklärt werden. Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse über die Transkription der Proteasen in Gametozyten, Gameten und Zygoten stellen erste Hinweise auf eine mögliche Proteasenbeteiligung in der Sexualphase von *P. falciparum* dar.

4.1.2.2 Der Versuch der Generierung von *knockout*-Parasiten und dessen Aussagekraft über die Proteasen

Zur Funktionsanalyse der einzelnen Proteasen wurde auf die Methodik zurückgegriffen, *knockout*-Parasiten mittels homologer *single-crossover* Rekombination unter Verwendung des KO-Vektors pDT_Tg23 herzustellen (Wu *et al.*, 1996). Dieser Vektor verleiht transformierten Parasiten eine Pyrimethamin-Resistenz durch die Sequenz für die Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase aus *Toxoplasma gondii* (TgDHFR-TS) unter der Kontrolle von untranslatierten 5' und 3' Sequenzen (untranslatierte Regionen, UTR) des Histoneichen Proteins 3 bzw. 2 (hrp3 bzw. hrp2). In das TgDHFR-TS-Gen sind zwei Punktmutationen eingefügt, die für die Pyrimethaminresistenz verantwortlich sind (Donald & Roos, 1993). Die transfizierten KO-Plasmide können in den wildtypischen Genlocus integrieren und/oder als extrachromosomal replizierendes Episom vervielfältigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass *Plasmodium*-Zellen mit Ausnahme des Zygoten-, Retorten- und Ookinetenstadiums haploid sind, lässt sich das jeweilige Gen durch die angewandte Methode über die Integration des Vektors unterbrechen und somit ausschalten. Durch das Absetzen des Selektionsdrucks für ca. zwei Wochen verlieren transfizierte Parasiten ausschließlich episomal vorliegende KO-Konstrukte im Laufe der asexuellen Vermehrungsphase (de Koning-Ward *et al.*, 2000). Die Wiederaufnahme des Selektionsdrucks für ca. drei weitere Wochen führt nach mehreren derart durchlaufenen Zyklen zu einer Parasitenpopulation, die ausschließlich in den jeweiligen Genlocus integrierte KO-Vektoren beinhalten. Alternativ dazu besteht die Möglichkeit, transfizierte Parasiten konstant für mehrere Wochen unter einem hohen Selektionsdruck zu kultivieren um eine Integration herbeizuführen. In der Theorie benötigt eine stabile erfolgreiche Integration in einen *P. falciparum*-Genlocus daher ca. drei Monate, was in starkem Kontrast zu der entsprechend benötigten Zeit von ca. zwei bis drei Wochen in *P. berghei* steht (de Koning-Ward *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Proteasen Calpain, GPI8, Metacaspase 2, Plasmepsin 6 und PfSub3 auf dem Vektor pDT_Tg23 basierende *knockout*-Konstrukte hergestellt und in asexuelle Parasiten transformiert. Parasitenkulturen die mit Calpain-KO- bzw. GPI8-KO-Konstrukten transfiziert wurden, wiesen nach einer Kultivierung ausschließlich unter Selektionsdruck keine Integration des Vektors in die Genloci auf. Plasmepsin 6-transfizierte Parasiten wurden unter alternierendem Selektionsdruck kultiviert und zeigten ebenfalls keine Integration des *knockout*-Konstruktes in den Genlocus. In den untersuchten transformierten Parasitenkulturen konnten spezifische Banden für den wildtypischen Genlocus und das extrachromosomal vorliegende KO-Konstrukt durch PCR-Analysen nachgewiesen werden. Ein Rekombinationsereignis der entsprechenden Genloci hatte nicht

Diskussion

stattgefunden und konnte auch im Falle von Plasmepsin 6 nicht durch die Anwendung von alternierendem Selektionsdruck herbeigeführt werden. Die Resistenz der transformierten Parasiten gegenüber dem Selektionsmarker Pyrimethamin ist somit ausschließlich auf das episomal exprimierende *DHFR-TS*-Gen des KO-Konstrukts zurückzuführen. Die transfizierten Parasiten wurden 12 (GPI8), 18 (Plasmepsin 6) oder 24 (Calpain) Wochen kultiviert und wiesen dennoch keine Integration des KO-Vektors auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass Calpain, GPI8 und Plasmepsin 6 im Laufe des asexuellen Vermehrungszyklus essentiell sind. Dies ließe sich unter anderem durch die Parasiten-Transfektion eines Komplementationskonstruktes oder die Fusion des Genlocus mit GFP oder einem Epitop (*tag*) klären. Dabei könnte der Genlocus entweder mutiert und in seiner Funktion geändert werden, komplett durch ein Reporter-gen ersetzt oder ein Epitop am Ende des Genlocus hinzugefügt werden (de Koning-Ward *et al.*, 2000). Derart genetisch veränderte Parasiten könnten unter anderem hinsichtlich der Proteasenfunktion (im Falle eines mutierten Genlocus), der genetischen Aktivität des Genlocus (im Falle eines Reporter-gens unter der Kontrolle des endogenen Promoters anstelle des wildtypischen Gens) oder der subzellulären Lokalisation des Genproduktes (im Falle der Epitop-Markierung) untersucht werden. Diese Vorgehensweise würde klären, ob der Genlocus für genetische Manipulationen zugänglich ist und ob die Proteasen in ihrer Funktion im asexuellen parasitären Vermehrungszyklus essentiell sind. Die Anwendung des Komplementationsvektors pCAM-BSD (Sidhu *et al.*, 2005; Dorin-Semblat *et al.*, 2007) könnte z.B. zur Klärung dieser Fragestellung beitragen. Zudem konnte kürzlich die erfolgreiche Genausschaltung mit diesem Vektor für *Pf*FNPA gezeigt werden (Simon *et al.*, 2009). Für die Serinprotease *Pf*Sub1 konnte ebenfalls kein klassischer Gen-*knockout* durch homologe Rekombination erzeugt werden (Yeoh *et al.*, 2007). Aufgrund der Tatsache, dass eine GFP-Fusion des 3' Endes des offenen Leserasters (*open reading frame*, ORF) ebenso fehlschlug, bedienten sich Yeoh *et al.* einer Fusion am 3' Ende des ORF mit dem wenige Aminosäuren umfassenden kleinen Hämagglutinin(HA)-Epitops des Influenzavirus A. Die anschließende erfolgreiche Fusion von HA und dem *Pf*Sub1-ORF ließ Studien zu, die *Pf*Sub1 als essentiell für das asexuelle Parasitenwachstum nachweisen konnten (Yeoh *et al.*, 2007). Dies verdeutlicht, dass fehlschlagende Rekombinationsversuche von Genloci darauf hinweisen können, dass das entsprechende Genprodukt funktionell wichtig für den asexuellen Vermehrungszyklus ist. Russo *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass die proteolytische Aktivität von Calpain für die Trophozoitenentwicklung essentiell ist (2009b), was in Übereinstimmung mit den hier erzielten Daten zu bringen ist. Für Calpain konnte in der genannten Studie unter anderem kein klassischer Gen-*knockout* hergestellt werden durch die ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit versuchte Integration von KO-Konstrukten über eine *single-crossover*-Rekombination. Die Untersuchung von GFP-fusioniertem Calpain und Protein-*knockdown*-

Diskussion

Analysen konnten dagegen erste Hinweise auf die Funktion von Calpain liefern und das Protein im Nucleolus und dem perinukleären ER lokalisieren (Russo *et al.*, 2009a; Russo *et al.*, 2009b). Für Plasmeypsin 6 ist es wahrscheinlicher anzunehmen, dass der Genlocus für Rekombinationsereignisse unzugänglich ist als das diese Aspartatprotease eine essentielle Funktion im asexuellen Vermehrungszyklus einnimmt. Das Genom von *P. falciparum* kodiert insgesamt für zehn Plasmeypsine (Coombs *et al.*, 2001), von denen für vier Vertreter intensive Einzel- sowie Doppel-Gen-*knockout*-Studien angefertigt wurden (Omara-Opyene *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Die KO-Parasiten zeichneten sich durch einen verlangsamten Metabolismus und ein reduziertes Wachstum aus, allerdings trat dieser Phänotyp nicht in allen Zellen auf und wurde daher als nicht sehr dominant beschrieben. Das Ausschalten von Plasmeypsin 1, 2, 4 und HAP einzeln oder in Kombination von Plasmeypsin 1 und 4 führt offenbar zu einer funktionellen Kompensation durch die übrigen Plasmeypsine (Genredundanz; Omara-Opyene *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Falls Plasmeypsin 6 eine ähnliche Funktion wie die gut charakterisierten Plasmeypsine 1, 2, 3 und HAP im Hämoglobinabbau besitzt, ist es unwahrscheinlich, dass diese Protease im asexuellen Parasitenwachstum essentiell ist und ihre Funktion nicht von den übrigen Plasmeypsinen übernommen werden kann. Diese Überlegungen bedeuten für den vorliegenden Fall der Plasmeypsin 6-KO-Studien, dass der Genlocus für Rekombinationsereignisse nicht zugänglich wäre. Diese Annahme könnte über die weiter oben beschriebene Transfektion eines Komplementationsvektors, einer Epitop-Markierung des Genlocus oder über Protein-*knockdown*-Studien (Banaszynski *et al.*, 2006) verifiziert werden.

Für Metacaspase 2-KO-Parasiten konnte eine erfolgreiche Integration des KO-Vektors in den Genlocus nach nur 12 Wochen Kultivierung unter Selektionsdruck nachgewiesen werden. In diesen Parasitenkulturen konnte zusätzlich der episomale KO-Vektor detektiert werden, zusätzlich zeichneten sich die Parasiten weiterhin durch das völlige Fehlen des wildtypischen Genlocus aus. Beim Versuch der Vereinzelung von Parasitenklonen starb diese Mischkultur ab und bedingte die erneute Elektroporation des KO-Konstrukts. In den neu transfizierten Parasitenkulturen konnte jedoch nach 20 Wochen ausschließlich unter Selektionsdruck sowie nach 18 Wochen unter alternierendem Selektionsdruck keine Integration des KO-Vektors in den Genlocus nachgewiesen werden. Die untersuchten transformierten Parasiten zeigten lediglich spezifische Banden für das episomal vorliegende KO-Konstrukt sowie für den Wildtypgenlocus. Warum eine erneute Transformation des KO-Vektors in asexuelle Parasitenstadien nicht in einer Integration in den Metacaspase 2-Genlocus resultierte bleibt unklar. Die erste Integration des KO-Vektors in den Genlocus verdeutlicht, dass der Genlocus prinzipiell für genetische Rekombinationsereignisse zugänglich ist. Zusätzlich bedeutet die Integration, dass die Metacaspase 2 für das asexuelle Parasitenwachstum nicht essentiell ist. Möglicherweise ist in den nachfolgenden transformierten Parasitenkulturen der

Diskussion

KO-Vektor durch ein erneutes *crossing-over* der homologen Sequenzen deletiert worden, wie beschrieben für *P. berghei* (Dechering *et al.*, 1997; Sultan *et al.*, 1997). Eine stabilere Integration in einen Genlocus ohne einen späteren Verlust des KO-Konstrukts könnte beispielsweise über die Transfektion des KO-Vektors pHTK erfolgen, was zu einem Doppel-*crossing-over* führt und das Gen damit ausschaltet (Duraisingh *et al.*, 2002).

Für *PfSub3* konnte in mehreren unabhängigen Elektroporationen die Integration des *knockout*-Vektors in den Wildtypgenlocus bewiesen werden. Die erste Integration konnte in drei unabhängigen Elektroporationen nach drei Wochen Kultivierung unter Pyrimethaminselektion nachgewiesen werden. Wiederholte Elektroporationen bestätigten dieses Ergebnis der Integration nach acht Wochen unter Pyrimethaminselektion. Die Integration des *knockout*-Vektors wurde an zwei unterschiedlichen Stellen des rekombinierten Genlocus untersucht und verifiziert. Auffällig dabei ist, dass die Integration des KO-Vektors in den Genlocus bei dem Versuch der Ausklonierung der Mischkultur in einzelnen Parasitenklonen nicht mehr detektierbar war. Durch die Integration des KO-Vektors sind die Parasiten bezüglich des *PfSub3*-Genlocus pseudo-diploid (siehe Abbildung 4.1A). Die homologen Sequenzen könnten nach erfolgter Integration allerdings wiederum miteinander rekombinieren und würden zu einem Ausschneiden des gesamten Konstrukts und zu einem Verlust der Genunterbrechung führen (Abbildung 4.1B). Dieses Ereignis ist für *P. berghei* beschrieben worden (Dechering *et al.*, 1997; Sultan *et al.*, 1997) und könnte eine Erklärung dafür liefern, warum die Ausklonierung der Mischkultur zu einem Verlust der Integration in den Parasitenklonen geführt hat. In einigen Fällen der untersuchten Einzelklone konnte im Gegensatz dazu eine 2,5-3 Kilobasenpaare (kbp) große Bande statt der erwarteten ca. 870 Basenpaare großen Bande für den rekombinierten Genlocus am 5' Ende nachgewiesen werden. Zudem wurde keine Bande für das 3' Ende des rekombinierten Genlocus in entsprechenden PCR-Analysen detektiert. Die 2,5-3 kbp Bande konnte wiederholt als deutliche, klare und distinkte Bande nachgewiesen werden, während andere leicht erkennbare Schmierbanden bei einer verwendeten Zyklenanzahl von 40 als unspezifisch gedeutet werden können. Das Vorkommen der 2,5-3 kbp großen Bande lässt sich nur durch das Auftreten von Rekombinationsereignissen der transfizierten Plasmid-DNA entweder vor oder nach chromosomaler Integration erklären. Die 2,5-3 kbp große Bande wurde durch das Oligonukleotidpaar amplifiziert, welches das 5' Ende des rekombinierten Genlocus detektiert. Diese Bande ist ca. 1630-2130 bp größer als die erwartete Bande von 870 bp. Es wäre möglich, dass eine Genduplikation zwischen der ausgewählten amplifizierten KO-Sequenz des *PfSub3*-Genlocus und dem 3' UTR des *hrp2*-Proteins aufgetreten ist (Abbildung 4.1C). Drei zusätzlich integrierte 3' UTR des *hrp2*-Proteins würden eine Größe von 1719 bp ausmachen, die insgesamt zu der detektierten Bande von 2,5-3 kbp führen würden. Alternativ könnten je eine einfache Kopie der *TgDHFR-TS*-Gensequenz oder

Diskussion

der 5' UTR des *hrp3*-Proteins zusätzlich mit je 1780 bp bzw. 1790 bp integriert haben. Da diese beiden Gensequenzen nicht direkt neben der KO-Sequenz angrenzen, ist dies jedoch weniger wahrscheinlich als eine Genduplikation der 3' UTR des *hrp2*-Proteins. Da das Oligonukleotidpaar in den diskutierten Parasitenklonen wiederholt keine Bande am 3' Ende des rekombinierten Genlocus amplifizieren konnte, wäre es zudem möglich, dass dieser Teil des Genlocus durch eine Deletion verloren gegangen ist. Ein weiteres häufig auftretendes Rekombinationsereignis ist die invertierte Religation nach Chromosomenbruch (Abbildung 4.1C). Die nacheinanderfolgenden Gensequenzen *hrp2-TgDHFR-TS-hrp3* würden in diesem Falle in invertierter Form wieder in das Genom integrieren. In diesem Falle würde das Oligonukleotidpaar am 5' Ende des rekombinierten Genlocus jedoch keine Bande amplifizieren können, was dieses Rekombinationsereignis als Erklärung ausschließt. Welches Rekombinationsereignis in den drei der fünf analysierten vereinzelt Parasitenklone stattgefunden hat und zu der detektierten 2,5-3 kbp großen Nukleotidbande führte, ließe sich eindeutig durch eine detaillierte Southern-Blot-Restriktionsanalyse der parasitären genomischen DNA klären.

Die Integration des *PfSub3*-KO-Konstrukts konnte in den Genlocus der Mischkulturen gezeigt werden und bedeutet, dass der Genlocus zugänglich und die Protease im asexuellen Vermehrungszyklus nicht essentiell ist bzw. dass ihre Funktion von anderen Enzymen kompensiert werden kann. Ein stabiles Ausschalten des *PfSub3*-Gens über die Integration eines KO-Konstruktes könnte über die Transfektion eines anderen KO-Vektors erfolgen. Dies könnte beispielsweise der KO-Vektor pHTK darstellen, welcher nach einer Transfektion zu einem Doppel-*crossing-over* führt und das Gen damit stabil ausschaltet (Duraisingh *et al.*, 2002). Eine weitere Möglichkeit stellt die Transfektion mit dem Vektor pCAM-BSD dar (Sidhu *et al.*, 2005; Dorin-Semlat *et al.*, 2007). In Harris *et al.* berichten die Autoren von der erfolgreichen Generierung einer *PfSub3*-KO-Parasitenlinie, die keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp in der asexuellen Vermehrungsphase von *P. falciparum* besitzen (2005). Dies beweist wiederum, dass *PfSub3* in den asexuellen Parasitenstadien nicht essentiell ist.

Die hier erzielten Ergebnisse über die Transfektion von Parasitenkulturen mit Protease-KO-Konstrukten liefern wichtige Information über die Zugänglichkeit der Genloci und die Essentialität der Proteasen im asexuellen Vermehrungszyklus.

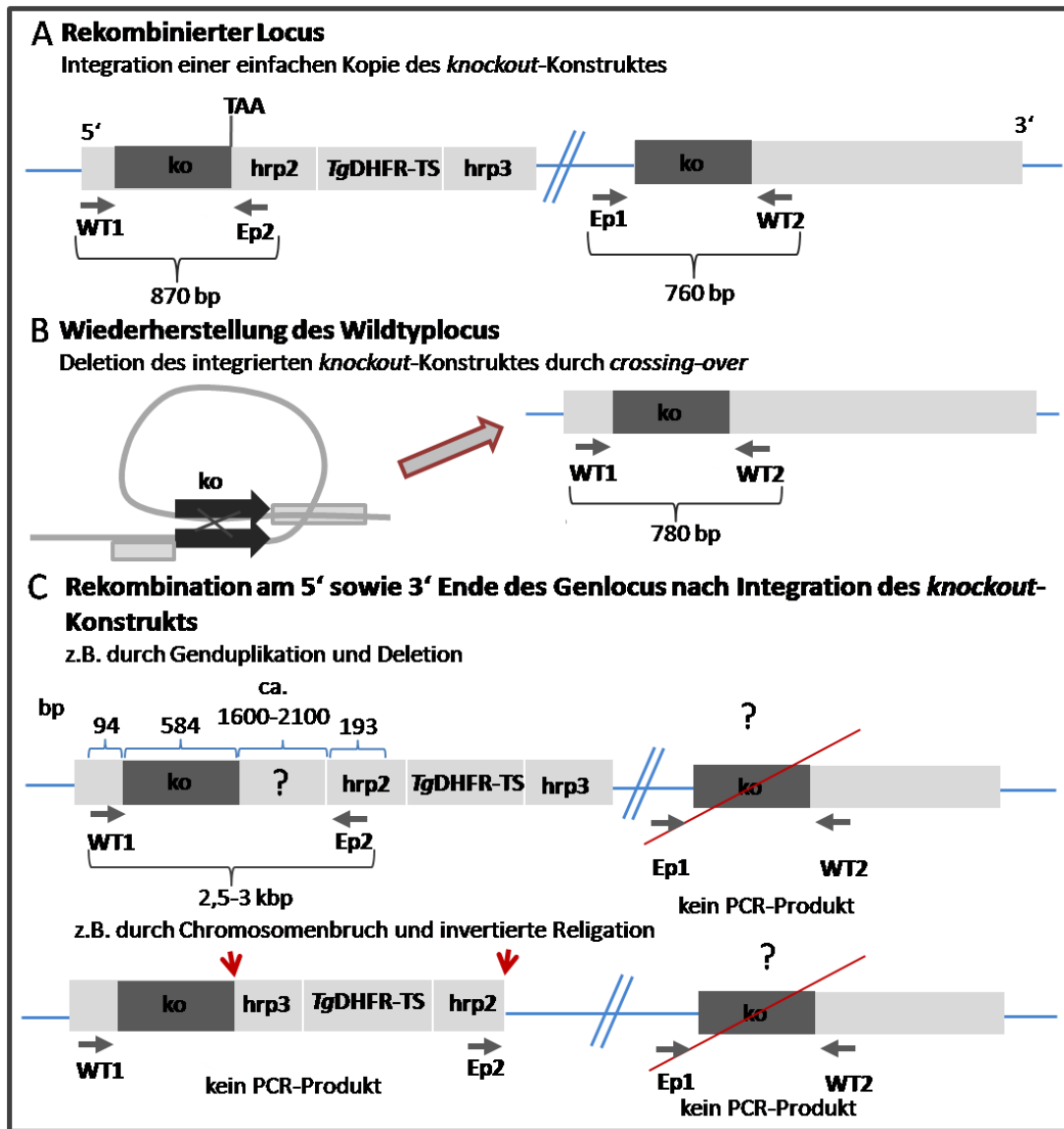


Abbildung 4.1. Mögliche Rekombinationsereignisse des *PfSub3*-Genlocus als Folge einer Transfektion mit dem *PfSub3*-*knockout*-Konstrukt. Die Integration einer einfachen Kopie des KO-Konstrukts würde zur Genausschaltung führen (A), was durch eine anschließende Deletion des Vektors wieder rückgängig gemacht werden würde (B). PCR-Analysen würden in Nukleotidbanden von Größen der erwarteten 870 bp für den rekombinierten Genlocus am 5' und von 760 bp am 3' Ende sowie des Wildtypgenlocus von 780 bp resultieren. C. Mögliche auftretende Rekombinationsereignisse wie Genduplikation und Deletion am 5' sowie 3' Ende des Genlocus nach der Integration des KO-Vektors. Eine Genduplikation würde eine in PCR-Analysen detektierte 2,5-3 kbp große Nukleotidbande am 5' Ende des rekombinierten Genlocus erklären. Die duplizierte Gensequenz müsste dabei eine Größe von ca. 1600-2100 bp umfassen. Ein Chromosomenbruch mit anschließender Religation (rote Pfeile) würde zu keinem amplifizierbaren PCR-Produkt führen und schließt als Erklärung für die 2,5-3 kbp große Nukleotidbande aus. Teile des KO-Konstrukts am 3' Ende des rekombinierten Genlocus könnten durch eine Deletion verloren gegangen sein, was sich in keinem amplifizierbaren PCR-Produkt manifestieren würde. Die Zahlen oberhalb des Genlocus in (C) bedeuten die Größen der eingezeichneten Gensequenzen. bp, Basenpaare; kbp; Kilobasenpaare.

4.1.2.3 Eine nähere Betrachtung der Expression der Subtilase PfSub3

In dieser Arbeit wurde ein 117 Aminosäuren umfassendes rekombinantes Protein aus der katalytischen Domäne von PfSub3 als Fusionsprotein mit dem Maltose-Binde-Protein (MBP) in *E.coli* hergestellt. Rekombinantes MBP wurde ebenfalls im bakteriellen System hergestellt und aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine dienten anschließend der Gewinnung von Immenserum aus Mäusen. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Immenserum verwendet, welche von der Firma Biogenes (Berlin) hergestellt wurden. Diese Antiseren wurden durch die Immunisierung von Mäusen mit einem 14 Aminosäuren umfassenden, vor der katalytischen Domäne von PfSub3 gelegenen Peptids generiert. Anschließende Western-Blot-Studien mit den selbst generierten Immenserum α -MBP-Sub3 und α -MBP detektierten die rekombinanten Proteine mit ihren erwarteten Größen von ca. 53 kDa (MBP-Sub3) bzw. 40 kDa (MBP). Da das Fusionsprotein nach der Expression, Aufreinigung und anschließenden Auftrennung mittels SDS-PAGE eine Größe etwas über den erwarteten 55 kDa aufzeigte, verifizierten die Western-Blot-Studien wiederum die errechnete Größe. Die Antiseren α -MBP-Sub3, α -Sub3-Peptidantikörper 1 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 wurden in Western-Blot-Studien getestet, ob sie die native Protease PfSub3 in asexuellen Parasitenlysaten sowie nicht-aktivierten und aktivierten Gametozytenlysaten detektierten. Alle drei Immenserum wiesen distinkte Proteinbanden in den Parasitenlysaten für PfSub3 nach. Konträre Ergebnisse wurden betreffend der Größe der detektierten Proteinbanden und der Expression in asexuellen Parasitenstadien und aktivierten Gametozyten erzielt. Mit dem Antiserum α -Sub3-Peptidantikörper 1 wurde eine Proteinbande in nicht-aktivierten sowie aktivierten Gametozyten sichtbar. Diese Proteinbande zeigte eine Größe zwischen 130 und 250 kDa auf. Das Antiserum α -Sub3-Peptidantikörper 2 wiederum hob distinkte Proteinbanden in nicht-aktivierten Gametozyten, aktivierten Gametozyten und asexuellen Parasitenstadien hervor, die eine Größe zwischen 100 und 130 kDa aufwiesen. Die entsprechende PfCCp2-Positivkontrolle detektierte die erste Proteinbande von PfCCp2 auf der erwarteten Größe von ca. 185 kDa. Die zweite Proteinbande von PfCCp2 wurde auf einer Größe etwas über den erwarteten 70 kDa detektiert. Die zweite Proteinbande von PfCCp2 ist entweder ein Produkt proteolytischer Prozessierung oder ist auf eine unspezifische Reaktion des Immenserums zurückzuführen (Scholz *et al.*, 2008). Da über diese Bande nur die ungefähre Angabe von ca. 70 kDa existiert, und diese Bande in einer anderen Arbeit bereits eine abweichende Größe gezeigt hat (Kühn, 2007), wird in diesem Fall die Größenabweichung der zweiten Proteinbande in der Positivkontrolle als vernachlässigbar angesehen. Die beiden untersuchten polyklonalen Peptidantikörper sind gegen ein Epitop aus der Prodomäne von PfSub3 gerichtet (siehe Abbildung 4.2). Es wurden zwei unterschiedliche Mäuse mit diesem Epitop immunisiert und die gewonnenen Antiseren

Diskussion

einzel untersucht. Die Parasitenlysate in den Western-Blot-Studien dieser Untersuchungen sind für beide verwendeten Immunsereen identisch, genauso wie die Probenvorbereitung. Dies deckt die Frage auf, warum Proteinbanden unterschiedlicher Größe von den beiden Immunsereen detektiert wurden. Zudem erkannte nur ein Immunsereum (α -Sub3-Peptidantikörper 2) ein Protein in asexuellen Parasitenlysaten. Diese offensichtliche Diskrepanz lässt sich zum gegebenen Zeitpunkt der Forschung über *PfSub3* nicht erklären. Die Verifizierung putativer Prozessierungsstellen in der Proteinsequenz und die Identifizierung möglicher Bindungspartner oder Substrate von *PfSub3* könnten zur Erklärung dieser Tatsache beitragen.

Das Immunsereum α -MBP-Sub3 detektierte eine distinkte Proteinbande in nicht-aktivierten Gametozyten und drei Proteinbanden in aktivierten Gametozyten. Die Banden zeigten eine Größe zwischen 55 und 70 kDa. Es wurde wie unter Verwendung des Antiserums α -Sub3-Peptidantikörper 1 keine Bande in asexuellen Parasitenlysaten festgestellt. Die Positivkontrolle detektierte *PfCCp1* auf einer Größe von etwas über den erwarteten 185 kDa. Dies könnte unter anderem auf eine unvollständige Denaturierung der Parasitenlysate vor der SDS-PAGE-Auftrennung zurückzuführen sein. Da die Proben jedoch für fünf Minuten bei 90 °C denaturiert und anschließend mit DTT versetzt wurden, ist diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich. Festzuhalten ist, dass die tatsächliche Größe der detektierten Proteine eventuell etwas kleiner als angegeben einzuordnen ist. Weiterhin deuten die drei Banden in dem aktivierten Gametozytenlysate auf eine unterschiedliche Prozessierung von *PfSub3* im Laufe der Gametogenese im Vergleich zur Prozessierung im Laufe der Gametozytogenese hin. Falls *PfSub3* als Serinprotease eine wichtige Rolle in der Gametenentwicklung zugesprochen werden kann, würde dies in Einklang mit der Gametogenese-Inhibition der Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren TLCK, TPCK und PMSF zu bringen sein (siehe Kapitel 4.1.1).

Die vollständige Gensequenz von *PfSub3* kodiert für insgesamt 769 Aminosäuren, was einem ca. 84 kDa großen Polypeptid entspräche. Eine Analyse der Aminosäuresequenz mit SMART-Blast (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2009) ergab, dass das Polypeptid ein Signalpeptid, eine *coiled-coil* Region und eine ca. 44 kDa große katalytische Domäne umfasst (Abbildung 4.2). Die Prodomäne von *PfSub3* ist ca. 38 kDa und nach Abspaltung des Signalpeptids hingegen ca. 36 kDa groß. Die gesamte Protease ist nach Abspaltung des Signalpeptids ca. 82 kDa groß (Abbildung 4.2). Diese Berechnungen sind rein theoretischer Natur und es wurden bisher keine Daten bezüglich der Proteinexpression von *PfSub3* publiziert. Die Größe einer Protease zu bestimmen ist insofern besonders schwierig, da Proteasen oftmals (autokalytischen) Prozessierungen unterliegen. Diese Prozessierungen sind für die Reifung von Proteasen wichtig und können in verschiedenen subzellulären Kompartimenten ablaufen, wie z.B. im ER, Zellzytosol oder in Vesikeln.

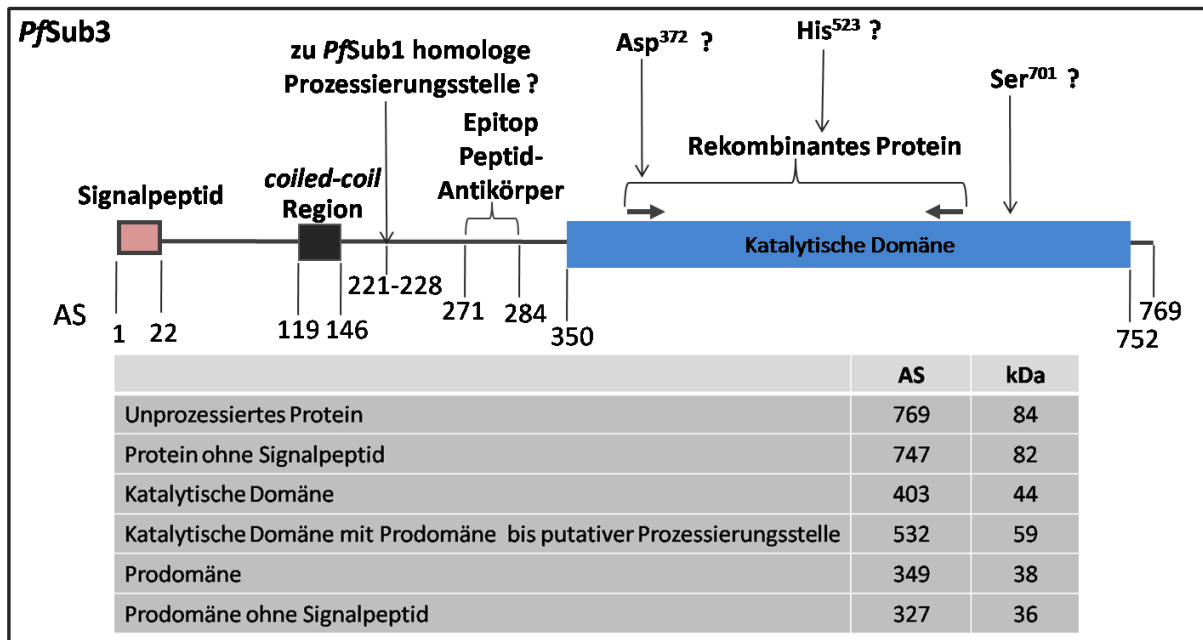


Abbildung 4.2. Schematische Darstellung des *PfSub3*-Polypeptids und dessen Größe nach möglichen Prozessierungen. Die *PfSub3*-Primärsequenz wurde mittels SMART-Blast analysiert. Identifizierte Proteinmodule umfassen eine N-terminale Signalsequenz, eine *coiled-coil* Region und die katalytische Domäne. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz von *PfSub3* und *PfSub1* konnte eine mutmaßliche Prozessierungsstelle in der Prodomäne von *PfSub3* sowie die putativ katalytisch wirksamen Aminosäuren Aspartat, Histidin und Serin identifiziert werden. Das Peptidantikörper-Epitop, sowie die das rekombinante Protein umfassende Region innerhalb der katalytischen Domäne sind angegeben. Die Zahlen innerhalb der *PfSub3*-Primärsequenz bedeuten die Positionen der markierten Regionen anhand der Aminosäurereihenfolge. Mögliche Prozessierungsvarianten für *PfSub3* sind angegeben und würden zu Proteinprodukten mit Größen zwischen 82 und 36 kDa führen. AS, Aminosäuren; kDa, Kilodalton.

Das Genom von *P. falciparum* kodiert für insgesamt drei Vertreter einer Familie der Subtilasen: *PfSub1*, *PfSub2* und *PfSub3* (Wu *et al.*, 2003; Withers-Martinez *et al.*, 2004). Subtilasen als Serinproteasen zeichnen sich durch ihre katalytische Triade Aspartat-Histidin-Serin aus und werden oftmals sezerniert (Withers-Martinez *et al.*, 2004). *PfSub1* und *PfSub2* prozessieren Oberflächenproteine des Malariaerregers im Laufe der Wirtszellinvasion (Harris *et al.*, 2005; Koussis *et al.*, 2009). *PfSub1* spaltet im Prozess des Parasitenausbruchs zusätzlich Proteine die der SERA-Familie angehören (Yeoh *et al.*, 2007). Während *PfSub1* in neu beschriebenen Organellen, sogenannten Exonemen lokalisiert ist, befindet sich *PfSub2* in den Mikronemen (Harris *et al.*, 2005; Yeoh *et al.*, 2007). Die Primärstruktur von *PfSub3* gleicht mehr der von *PfSub1* als der von *PfSub2*, und große Bereiche sind homolog zueinander (Abbildung 4.3). Die Gensequenz von *PfSub3* besteht wie die von *PfSub1* aus nur einem Exon, beide kodieren für keine Transmembrandomäne (im Gegensatz zu *PfSub2*) sowie für eine ähnliche Größe mit 688 bzw. 769 Aminosäuren. *PfSub1* unterliegt insgesamt

Diskussion

drei proteolytischen Prozessierungen (Sajid *et al.*, 2000; Withers-Martinez *et al.*, 2002). Die Signalsequenz wird nach der Expression des nativen Enzyms abgespalten. Während die autokatalytische Prozessierung und damit Reifung von *PfSub1* im ER erfolgt, ist der Ort der folgenden Prozessierung unbekannt. Die katalytisch aktive Protease akkumuliert in den Exonemen (Yeoh *et al.*, 2007).

Keine der in dieser Arbeit detektierten Proteinbanden entsprechen der theoretischen Größe von *PfSub3* als unprozessiertes Enzym. Die von den Immunsereen α -Sub3-Peptidantikörper 1 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 identifizierten Proteinbanden zwischen 100 und 130 kDa bzw. 130 und 250 kDa sind größer als die vorausgesagten 84 kDa. Durch die Inkubation von 90 °C und die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen ist es jedoch unwahrscheinlich, dass die Protease an mögliche Substrate gebunden im Western-Blot detektiert wurde. Wahrscheinlicher ist eine Dimerbildung der Protease unter Ausbildung kovalenter Bindungen anzunehmen. Eine Dimerbildung von *PfSub3* würde eine Größe von ca. 168 kDa ergeben, was eine Erklärung für die detektierten Proteinbanden des Antiserums α -Sub3-Peptidantikörper 1 liefern würde. Ein Beispiel für ein Enzym welches als Dimer vorliegt, stellt die Aspartatprotease von HIV dar (Meek *et al.*, 1989; Wlodawer *et al.*, 1989). Eine Inkubation mit 0,02 % SDS zerstörte jedoch die Dimerbildung der Protease (Schneider & Kent, 1988), was auf eine nicht-kovalente Bindung hinwies. Eine kovalente Modifikation von *PfSub3* wäre die einzige Erklärung der detektierten Proteinbanden unter Verwendung der polyklonalen Peptidantikörper. Posttranslationale Modifikation wie das Anhängen von Fettsäuren wie Myristat oder Palmitat können allerdings ausgeschlossen werden, da die Anhängung von Myristinsäure an Proteine erfolgt, die am Aminoende die Aminosäuresequenz Methionin-Glycin aufweisen (Resh, 1999). Diese Reihenfolge der Aminosäuren besitzt *PfSub3* auch vor dem Hintergrund möglicher Prozessierungen nicht. Eine Anhängung von Palmitinsäure erfolgt unter anderem an Proteine mit Transmembrandomäne, Farnesyl-Anker oder an bereits myristilierte Proteine (Bijlmakers & Marsh, 2003). Dies trifft ebenfalls auf *PfSub3* nicht zu. Eine Glykosylierung von *PfSub3* ist ebenso auszuschließen, da Glykosylierungen in *P. falciparum* mit Ausnahme der Modifikation durch einen GPI-Anker nicht vorkommen (von Itzstein *et al.*, 2008). Eine Analyse der *PfSub3*-Gensequenz mittels SMART-Blast (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2009) identifizierte ebenfalls keinen GPI-Anker (siehe Abbildung 4.2).

Die von dem Immunsereum α -MBP-Sub3 identifizierten Banden von zwischen 55 und 70 kDa sind kleiner als die unprozessierte Form von *PfSub3* mit 84 kDa. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Bande der entsprechenden Positivkontrolle *PfCCp1* etwas über der erwarteten Größe von 185 kDa liegt, können die tatsächlichen Größen der *PfSub3*-Proteinbanden als sogar noch kleiner angenommen werden. Diese Proteinbanden liegen in einem Größenbereich, der auf die katalytische Domäne mit 44 kDa hinweisen könnte. Der

Diskussion

Vergleich der Proteinsequenzen von *PfSub1* und *PfSub3* unter Anwendung des Programms Clustal W2 führte zur Identifizierung von Sequenzhomologien (Abbildung 4.3). An den Stellen der katalytisch aktiven Aminosäurenreste von *PfSub1* liegen die gleichen Aminosäuren in der Proteinsequenz von *PfSub3*. Diese Aminosäuren könnten bei *PfSub3* ebenso die katalytische Triade darstellen. Die Prozessierungsstelle in der Prodomäne von *PfSub1* (LV SADNIDIS; Sajid *et al.*, 2000) zeigt zwar keine eindeutigen Sequenzhomologien zu *PfSub3*, dennoch sind einige Aminosäuren ähnlich. Eine Prozessierung innerhalb der Prodomäne von *PfSub3* wäre ebenso möglich, und würde auf eine Größe von ca. 59 kDa hinauslaufen. Diese Größe würde die detektierte Proteinbande in den nicht-aktivierten Gametozyten unter Verwendung des Immunsersums α -MBP-Sub3 erklären. Dennoch beweisen die drei Proteinbanden des aktivierten Gametozytenlysats, dass eine Prozessierung in aktivierten Gametozyten anders verläuft als in nicht-Aktivierten. Die Aktivierung von Gametozyten scheint in einer Spaltung von *PfSub3* in drei Polypeptide unterschiedlicher Größe zwischen 55 und 70 kDa zu resultieren. Die Endprodukte sind allesamt größer als das Produkt der *PfSub3*-Prozessierung in den nicht-aktivierten Gametozyten. Ein gut charakterisiertes Beispiel eines prozessierten Proteins im Laufe der Gametogenese ist das sexualstadienspezifische Protein *Pfs230*. In nicht-aktivierten Gametozyten liegt *Pfs230* als 360 kDa großes Polypeptid vor, welches nach der Gametozyten-Aktivierung in vier unterschiedliche Proteine gespalten wird (Williamson *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1996; Brooks & Williamson, 2000). Die beiden großen Proteinfragmente von 307 und 300 kDa bleiben mit der Gametenmembran assoziiert, während die beiden Fragmente von 47 und 35 kDa in die Umgebung abgegeben werden. Eine eindeutige Aussage über die verschiedenen detektierten Proteinbanden könnte über eine massenspektrometrische Analyse erzielt werden. Diese Vorgehensweise würde klären, ob in den Banden weitere Proteine mit *PfSub3* assoziiert vorliegen. Dies würde auch den eindeutigen Beweis dafür liefern, dass *PfSub3* von den Immunsereen erkannt wird und keine unspezifische Kreuzreaktion des polyklonalen Antiserums die Banden in Western-Blot-Studien hervortreten lässt. Eine andere Methodik zur Klärung der Fragestellung ob *PfSub3* mit weiteren Proteinen in einem engen Komplex assoziiert vorliegt, wäre die Immunpräzipitation. Dabei könnten die drei verschiedenen Antiseren als Köder verwendet und unter Einsatz von Antiseren bekannter Proteine die Beute aus Parasitenlysaten analysiert werden. Ein Nachteil dieser Methodik wäre allerdings deren Begrenzung auf die Verfügbarkeit der verschiedenen Antiseren. Hinsichtlich der Tatsache, dass die tatsächliche Größe von *PfSub3* schwer in der Theorie zu bestimmen ist, und das selbst die Immunsereen α -Sub3-Peptidantikörper 1 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 voneinander abweichende Proteinbanden detektieren, sind die Größen der hier gezeigten Proteinbanden kritisch zu betrachten. Erst nach der Identifizierung von *PfSub3*-Prozessierungsstellen, möglichen

PfSub3-Substraten und Interaktionspartnern können weitere Aussagen zur Proteinexpression von *PfSub3* getroffen werden.

PFE0370c	MMLNKKVVALCTLTLLHLFCIFLCLGKEVRSEENGKIQDD---AKKIVSELRFLEKVED--- 55	proz.
PFE0355c	-MINRQYFIWYIFIFNIINKIYFENIRYVKNYEVVIRKKKNIERGIQNDFAFIRRYKSR 59	Signalpeptid
PFE0370c	VIEKSNIGGNEVDADENSFNPDEVPVIEEIEEIKMRELKDVKEEKNNKNDHNNNNNISS 115	
PFE0355c	LLSDVSYKNSIKGKNRVDKEGDIKKYDNDNDKMDNSYDYKNKSIKENETKIRKEQVIS 119	
PFE0370c	SSSSSSNTFGEEKEEVSKKKKLRLLIVSENHATTPSFFQESLLEPDVLSFLESKGNLSNL 175	
PFE0355c	LDKRYNRNINEKEEIKKKIKDIQRKRLIYIFKQDNTILSSRNKYKHFMKVLSSCGHIEKL 179	1. Proz.?
PFE0370c	KNINSMITELKEDTTPDEELIS--YIKILEEKGALIESDKLVSADNIDTSGIKDAIRRGEE 233	
PFE0355c	TFINFYLYEFPKSINNEMLKICLRLLSRRINVENDNQISHTVQMKSYNNNNNKWDNI 239	
PFE0370c	NIDVNDYKSMLEVENDAEDYDKMFGMFNESHAAATSKRRRHSTNERGYDTFSSPSYKTYSK 293	katalyt. Asp ?
PFE0355c	NSKKNCIYQIKDKIKDLPNVSPASFTFTSISTSPYTLKLRDRNK--YANDKNHIFKLNHS 297	
PFE0370c	SDYLYDDNNNNNYSHSSNGHNSSSSRSSSRSPGKYHFNDEFRLQWGLDLSRLDE 353	
PFE0355c	NKHNNNNNNNDYHNNKSNYHS---HSSAKCQTPQRLNKKMIGTNIIDGYDIIQMEE 353	
PFE0370c	TQELINEHQVMSTRICVIDSGIDYNHPDLKDNIELN---LKE LHGRKGFDDDDNNGIVDDI 410	
PFE0355c	GLNLSHNYELNDVNVCIIDTGI DENHIDLKDNIEKTKFMKHSYKKNYIDGINNIESDNI 413	
PFE0370c	YGANFVN----- 417	katalyt. His ?
PFE0355c	DGINNIESDNIDGINNIESDNIDGINNIESDNIDGINNIESDNIDGINNIKSSDNIKSSD 473	
PFE0370c	-----NSGNPMDDNYHGTHVSGIISA 438	
PFE0355c	NIKSSDNINSSDNIKSSDNNVHPTMLRNKLYLKKKKECSNYNTSNDGHHGHTFIAGIAG 533	
PFE0370c	IG--NNNIGVGVVNSKLIICKALDEHKLGRIGDMFKCLDYCISRNAHMGFSFSFDEYS 497	
PFE0355c	NSPKGKGIKIGISKKAKLIICKALNNNAGYISDILECFNFCAKKARIINASFASHTHY 593	
PFE0370c	GIENSSVEYLQRKGI LFFVSNCSHPKSSTPDIRKCDLSINAKYPPILSTVYDNI SVVA 557	
PFE0355c	PSLFQALKELQDKDILVISSGNCSSNSKCKQAFQECNINIQKLYPAAYSADLNNI SVS 653	katalyt. Ser ?
PFE0370c	NLKKNDNNNHYSLSINSFYSNKYQLAAGPTNIYSTAPHNSYRKLNGTSMAPHVAAIAS 617	
PFE0355c	NIIQ-QSNGNIVLSPDSCYSENYVHLAAPGGNIIISTFPNNKYAISSGTSFSASVITGLAS 712	
PFE0370c	LIFSINPDLSYKKVIQILKDSIVYLPKLNMAWAGYADINKAVNLAIKSKKTYINSNIS 677	
PFE0355c	LVLINSNLTSSQVIELFKKSIVQTKSLENKVKWGGFINVYDLVRFITISLPKDKDE--- 769	
PFE0370c	NKWKKKSRYLH 688	
PFE0355c	-----	

Abbildung 4.3. Vergleich der Aminosäuresequenzen der Proteasen *PfSub1* (PFE0370c) und *PfSub3* (PFE0355c). Die Aminosäuresequenzen der Proteasen wurden der *Plasmodium*-Datenbank PlasmoDB (www.plasmodb.org) entnommen und mit dem Programm Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) miteinander verglichen. Große Bereiche der Sequenzen weisen Homologien auf. An den Positionen der katalytisch wirksamen Aminosäuren Aspartat, Histidin und Serin von *PfSub1* kommen dieselben Aminosäuren in *PfSub3* vor. Eine Prozessierungsstelle in der Prodomäne von *PfSub1* weist geringe Homologien zu *PfSub3* auf (1. Proz.). Beide Proteine weisen eine N-terminale Signalsequenz auf, die ebenfalls abgespalten wird (vorausgesagt für *PfSub3* mittels SMART-Blast; <http://smart.embl-heidelberg.de>). Um den putativen Histidinrest befindet sich in der *PfSub3*-Sequenz ein ungewöhnliches HGHGHTFIAG-Aminosäurenmotiv (Withers-Martinez *et al.*, 2004). Stern, identische Aminosäuren, Doppelpunkt, konservierte Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, Punkt, halb-konservierte Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften; Strich, kein Aminosäurevergleich aufgrund unterschiedlicher Größen der Primärsequenzen; kurzer Pfeil, Prozessierungsstelle.

Diskussion

Die *Pf*Sub3-Proteinexpression wurde zusätzlich an Methanol-fixierten asexuellen Parasiten sowie Sexualstadien mittels indirekter Immunfluoreszenz getestet. Die verwendeten Immunsereen α -MBP-Sub3, α -Sub3-Peptidantikörper 1 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 zeigten eine Markierung parasitierter Erythrozyten sowie eine schwache Markierung nicht-parasitierter Erythrozyten. Durch die Erstellung eines Profils am konfokalen Laserrastermikroskop konnte bewiesen werden, dass die Markierung der Parasiten durch die Immunsereen α -MBP-Sub3 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 spezifisch ist. Die Markierung von fixierten parasitierten Erythrozyten unter Einsatz des Antiserums α -Sub3-Peptidantikörper 1 konnte aufgrund des LSM-Profiles zwar nicht als unspezifisch erachtet werden, allerdings war eine Unterscheidung von parasitierten und nicht-parasitierten Erythrozyten mikroskopisch nicht möglich, ohne eine jeweilige Fluoreszenzanalyse durchzuführen. Daher wurde die *Pf*Sub3-Expression in den anschließenden detaillierten indirekten Immunfluoreszenzstudien ausschließlich unter Einsatz der Immunsereen α -MBP-Sub3 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 untersucht. Die Tatsache, dass das Immunsereum α -Sub3-Peptidantikörper 1 in der Immunfluoreszenz unspezifisch reagiert hat, lässt nicht den Rückschluss zu, dass die von dem Serum in Western-Blot-Studien detektierten Proteinbanden ebenfalls unspezifisch sind. Polyklonale Antiseren detektieren Proteine oftmals durch Anwendung der genannten Methoden in unterschiedlicher Spezifität. Das bedeutet z.B., dass ein Protein unter Einsatz eines bestimmten Antiserums in Western-Blot-Studien exzellent detektiert wird, und gleichzeitig keine Markierung des Proteins in der indirekten Immunfluoreszenz erzielt werden kann.

Die Immunsereen α -MBP-Sub3 und α -Sub3-Peptidantikörper 2 zeigten eine spezifische *Pf*Sub3-Markierung in Trophozoiten, Schizonten, aktivierten und nicht-aktivierten Stadium-IV-V-Gametozyten, Makrogameten und Mikrogametozyten. Die Markierung erschien punktiert oder homogen, dabei unterschieden sich die Markierungen der beiden unterschiedlichen Immunsereen oder sie zeigten das gleiche Muster. Im Falle der Trophozoiten konnte die Markierung als homogen sowie als punktiert für beide Seren gezeigt werden. Nicht-aktivierte und aktivierte Sexualstadien unterschieden sich ebenso nicht deutlich voneinander, die *Pf*Sub3-Markierung erschien punktiert oder homogen.

Allgemein lässt sich an dieser Stelle anmerken, dass sich nur ein geringer Prozentsatz der fixierten Parasiten durch eine spezifische Markierung für *Pf*Sub3 auszeichnete. Lediglich ein grob geschätzter Anteil von einem Sechstel der untersuchten parasitierten Zellen wies eine *Pf*Sub3-Markierung auf. Zudem ist es wichtig anzumerken, dass die in dieser Arbeit gezeigten *Pf*Sub3-Markierungen nicht darauf schließen lassen, dass die Protease in Stadium-I-III-Gametozyten oder Mikrogameten (entweder frei oder noch mit dem aktivierten Mikrogametozyten verbunden) nicht exprimiert wird. Es konnten zwar keine *Pf*Sub3-positiven Stadium-I-III-markierten Gametozyten und Mikrogameten identifiziert werden, allerdings

Diskussion

könnte das auf den ohnehin geringen Anteil der *PfSub3*-positiven Zellen zurückzuführen sein.

Die wichtige Aussage der gezeigten *PfSub3*-Markierungen liegt in der Tatsache, dass in asexuellen Parasitenstadien und Sexualstadien *PfSub3* vorliegt, sowie dass das Muster dieser Serinprotease der *PfSub3*-positiven Zellen variabel erscheinen kann. Dies könnte auf die jeweilige Aktivität des Enzyms in der Zelle zurückzuführen sein. Weiterhin verifiziert die *PfSub3*-Markierung der asexuellen Parasitenstadien die Proteinbande der asexuellen Parasitenstadien des Immunsersums α -Sub3-Peptidantikörper 2 in den Western-Blot-Studien. Umgekehrt deckt dies erneut die Frage auf, warum das Immunsersum α -MBP-Sub3 in Immunfluoreszenzstudien *PfSub3* in Trophozoiten und Schizonten erkennt, aber keine Proteinbande in gemischten asexuellen Parasitenstadien in Western-Blot-Studien detektiert wurde. Die Western-Blot-Studien unter Einsatz des Immunsersums α -MBP-Sub3 ließen weiterhin auf eine unterschiedliche Prozessierung von *PfSub3* in nicht-aktivierten und aktivierten Sexualstadien vermuten. Eine unterschiedliche Prozessierung kann mit der Methodik der Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen und konnte somit nicht verifiziert werden. Eine mögliche Sezernierung von *PfSub3* kann anhand dieser gezeigten Daten ebenso nicht vermutet werden. Es ist bekannt, dass *PfSub1* in den sekretorisch aktiven Exonemen von Schizonten gespeichert ist, und vor dem Parasitenausbruch in die parasitophore Vakuole abgegeben wird (Yeoh *et al.*, 2007). Eine HA-Epitop-Markierung von *PfSub1* manifestierte sich in einem punktförmig erscheinenden Muster, was unter anderem die Autoren auf eine Speicherung in diesen Organellen schließen ließ. Dies legt die Vermutung nahe, dass *PfSub3* ebenso in sekretorisch aktiven Organellen gespeichert sein könnte, und das die Abgabe von *PfSub3* aufgrund eines spezifischen Signals in die parasitophore Vakuole in einer gleichmäßig verteilten Oberflächen-Markierung des Parasiten in Immunfluoreszenzstudien resultieren würde. Ob *PfSub3* in sekretorisch wirksamen Organellen wie den Rhoptrien, Mikronemen, dichten Granula oder den Exonemen lokalisiert ist, könnte mittels Immunfluoreszenzstudien oder transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen geklärt werden. Dabei würden entsprechende Antiseren als Markierungen für den jeweiligen Organellentyp zum Einsatz kommen, wie z.B. α -RhopH2 als Rhoptrien-Marker (Ling *et al.*, 2003), α -*PfAMA-1* als Mikronemen-Marker (Harris *et al.*, 2005) und α -RESA als Marker für dichte Granula (Aikawa *et al.*, 1990). Die Exonemen sind bisher nur im Zusammenhang mit *PfSub1* beschrieben worden (Yeoh *et al.*, 2007). Der Einsatz von *PfSub3*-Antiserum könnte in fixierten *PfSub1*-HA-markierten Parasitenlinien eine mögliche Kollokalisierung der beiden Proteasen aufdecken.

Die Daten bezüglich der *PfSub3*-Proteinexpression haben zusammenfassend gezeigt, dass diese Protease offenbar in asexuellen Parasitenstadien sowie in den Sexualstadien translatiert wird. Dies bedeutet, dass sie als Kandidat für die durch die Cystein-/ und

Serinprotease-Inhibitoren gehemmte Mikrogametozytenexflagellation (vergleiche Kapitel 4.1.1) gehandelt werden kann. Ob *PfSub3* in der Sexualentwicklung von *Plasmodium* involviert ist und wie das Potential von *PfSub3* als TBM-Kandidat einzuschätzen ist, kann in Zukunft auf der Grundlage der hier gezeigten Ergebnisse weiter erforscht werden.

4.2 Auf dem Weg zur vollständigen Aufklärung der Sexualentwicklung von *P. falciparum* – die Bedeutung von neuartigen Zell-Zellverbindungen

Im Zuge der Identifizierung molekularer Wechselwirkungen während Befruchtungsvorgängen von *Plasmodium* sind die hier beschriebenen Gametenfilamente von Frau Dr. G. Pradel entdeckt worden. Die erste detaillierte Beschreibung der Filamentmorphologie sowie die Aufstellung einer These über eine mögliche Funktion der Filamente konnten unter anderem aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit erfolgen (Pradel *et al.*). Einige der wichtigsten Charakteristika der bisher in der Literatur beschriebenen membranösen Zell-Zellverbindungen konnten für die in dieser Arbeit dargestellten membranösen Zellausläufer demonstriert werden (vergleiche Tabelle 1.2 und 4.1). Die Identifizierung und Beschreibung der Gametenfilamente stellt einen weiteren wichtigen Schritt in Richtung der vollständigen Aufklärung der Sexualentwicklung von *Plasmodium* dar.

4.2.1 Die Beteiligung sexualstadienspezifischer Proteine an der Filamentbildung

Detaillierte Immunfluoreszenzstudien konnten typische sexualstadienspezifische Proteine wie *Pfs25*, *Pfs230*, *Pfs48/45* und *PfCCp4* auf der Oberfläche der Gametenfilamente identifizieren (Pradel *et al.*, in Revision). Diese Proteine werden allesamt in Gametozyten und Gameten exprimiert (Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Vermeulen *et al.*, 1986; Fries *et al.*, 1990; Williamson *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1996; Scholz *et al.*, 2008). Die Expression von *PfCCp4* und *Pfs25* bleibt zudem bis zum Ookinetenstadium bestehen (Vermeulen *et al.*, 1985; Scholz, 2007). Weiterhin zeichnen sich die Proteine durch ihre Assoziation mit der parasitären Plasmamembran aus. *Pfs48/45* und *Pfs25* sind über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden (Vermeulen *et al.*, 1986; Kaslow *et al.*, 1988; Kumar & Wizel, 1992), während *Pfs230* mit *Pfs48/45* in einem Komplex vorliegt (Kumar, 1987; Kumar & Wizel, 1992), und *PfCCp4* wiederum mit *Pfs230* assoziiert ist (Scholz *et al.*, 2008). *Pfs230* wird im Laufe der Gametogenese prozessiert, wobei die resultierenden zwei größeren Proteinfragmente weiterhin mit der parasitären Plasmamembran assoziiert bleiben (Williamson *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1996; Brooks & Williamson, 2000). Zusätzliche Immunfluoreszenzstudien die von Frau Dr. G. Pradel und Frau L. Sologub durchgeführt

Diskussion

wurden deckten auf, dass die gametozyten- und gametentypischen Proteine *PfCCp1*, *PfCCp2* und *PfCCp3* nicht mit der Filamentmembran assoziiert sind (Pradel *et al.*, in Revision). Die *PfCCp*-Proteine werden während der Gametozytogenese exprimiert, im Laufe derer sie in der parasitophoren Vakuole Multiproteinkomplexe bilden (Pradel *et al.*, 2004; 2006; Scholz *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2009). Die Proteinkomplexe werden auf der Oberfläche der Makrogameten exponiert, was die Fertilisation begünstigen könnte (Simon *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte für *PfCCp1-3* gezeigt werden, dass sie im Laufe der Gametogenese teilweise in die Umgebung abgegeben werden (Pradel *et al.*, 2004). Als einziges Mitglied der *PfCCp*-Proteinfamilie wird *PfCCp4* auch über das Gametenstadium hinaus exprimiert (Scholz, 2007). Eine Sezernierung von *PfCCp4* in die extrazelluläre Umgebung konnte nicht beobachtet werden. Die sexualstadienspezifischen Proteine *PfPeg3* und *PfPeg4* liegen in Gametozyten mit der parasitären Plasmamembran sowie der parasitophoren Vakuolenmembran assoziiert vor (Lauer *et al.*, 2000; Furuya *et al.*, 2005; Silvestrini *et al.*, 2005; Alano, 2007; Lanfrancotti *et al.*, 2007). *PfPeg3* wird zudem vornehmlich in den osmiophilen Körpern der weiblichen Gametozyten akkumuliert und im Laufe der Gametogenese freigelassen (Ponzi *et al.*, 2009). Die Verknüpfung dieser Proteine mit den Gametenfilamenten wurde von Frau Dr. G. Pradel und Frau L. Sologub durchgeführten Immunfluoreszenzstudien unter Anwendung entsprechender Immunseren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Filamente nicht mit *PfPeg3* und *PfPeg4* verbunden sind (Pradel *et al.*, in Revision). Zusammengefaßt kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Assoziation der Gametenfilamente mit Proteinen, die konstant und ausschließlich mit der parasitären Plasmamembran assoziiert sind, ein starker Hinweis darauf ist, dass die Filamente Ausläufer der parasitären Plasmamembran darstellen (Pradel *et al.*, in Revision).

Die Assoziation der Filamente mit sexualstadienspezifischen Proteinen ließ die Vermutung zu, dass diese Proteine eine wichtige Rolle in der Filamententwicklung spielen. Die Untersuchung von KO-Parasitenlinien in denen einzelne dieser Proteine fehlten ergaben, dass diese KO-Parasiten ebenfalls charakteristische membranöse Zellausläufer ausbilden (Pradel *et al.*, in Revision). Für die Analyse der vorliegenden Arbeit dienten die Parasitenlinien *PfCCp1-4*-KO (Pradel *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2009), *Pfs48/45*-KO (van Dijk *et al.*, 2001), und *Pfs230*-KO (Eksi *et al.*, 2002; Eksi *et al.*, 2006). Die dabei verwendete *Pfs230*-KO-Zelllinie produziert auffällig viele Gametozyten (Prof. Dr. K.C. Williamson, unveröffentlichte Ergebnisse), und basiert auf dem genetischen Hintergrund der *Pfs230*-KO-Mutante D1 (Eksi *et al.*, 2002). Die Ergebnisse zeigten, dass obwohl die Proteine *Pfs230*, *Pfs48/45*, *PfCCp2* und *PfCCp3* sowohl bei der Befruchtung als auch bei daraus resultierenden nachfolgenden Prozessen in der Sexualentwicklung des Malariaerregers eine wichtige Rolle spielen, scheint zumindest das Fehlen einzelner Proteine das Ausbilden der

Diskussion

Gametenfilamentente nicht zu verhindern. Auch eine Abwesenheit von *PfCCp1* oder *PfCCp4* blockiert die Filamentbildung nicht (Pradel *et al.*, in Revision).

Zusätzliche Immunfluoreszenzstudien, die unter der Leitung von Frau PD Dr. G. Pradel durchgeführt wurden, untersuchten detailliert die Filamentlänge, den prozentualen Anteil der filamentpositiven Gameten sowie die Anzahl der Filamente pro Zelle in Wildtypparasiten, *PfCCp1*-, *PfCCp3*-, *PfFNPA*-, *Pfs230*- und *Pfs48/45*-KO-Parasiten (Pradel *et al.*, in Revision). Für diese Untersuchung wurde die *Pfs230*-KO-Linie D2 (Eksi *et al.*, 2002) verwendet. Eine Quantifizierung der letztgenannten Charakteristika war für die Zelllinie D1 nicht möglich, obwohl die Ausbildung von Zellfilamenten in entsprechenden Kulturen beobachtet wurde. Die *Pfs230*-KO-Parasitenlinie D1 exprimiert ein noch verkürzteres Fragment des *Pfs230*-Proteins als die Parasitenlinie D2 (452 Aminosäuren im Vergleich zu 950 Aminosäuren). Beide *Pfs230*-KO-Parasitenlinien D1 und D2 sowie die Parasitenlinie *PfFNPA* zeigten die Ausbildung der hier beschriebenen Gametenfilamente (Pradel *et al.*, in Revision). Die Analyse wurde vergleichend für jeweils zwei verschiedene Parasitenkulturen derselben Zelllinie durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Filamentlänge einer großen Variabilität unterworfen ist. Wildtypische Parasiten wiesen eine Filamentlänge zwischen 2 und 140 μm auf, während KO-Parasiten eine Filamentlänge zwischen 2 und 180 μm zeigten. Der Mittelwert der Anzahl der Filamente pro Zelle wurde in wildtypischen Parasiten auf einen Wert zwischen 2,7 und 3,3 sowie in KO-Parasiten auf einen Wert zwischen 2,0 und 3,3 bestimmt. Es konnte weiterhin belegt werden, dass der prozentuale Anteil der filamentpositiven Zellen in wildtypischen Parasiten, *PfCCp3*- und *PfFNPA*-KO-Parasiten zwischen 48 und 59 % beträgt. *PfCCp1*-, *Pfs230*-KO(D2)- sowie *Pfs48/45*-KO-Parasiten zeigten hingegen einen deutlich reduzierten prozentualen Anteil der filamentbildenden Zellen zwischen 22 und 36 %. Dies könnte bedeuten, dass die Proteine *PfCCp1*, *Pfs230* und *Pfs48/45* einen Einfluss auf die Filamententwicklung ausüben, obwohl entsprechende KO-Kulturen Gametenfilamente ausbilden und das Protein *PfCCp1* nicht mit der Oberfläche der Filamente verknüpft ist. Zusätzlich demonstrierten die Ergebnisse, dass die Filamentlänge im Vergleich zwei verschiedener Kulturen derselben Zelllinie deutlich variieren kann. Dabei zeigte z.B. die *Pfs230*-KO-Zelllinie D2 im Mittelwert eine Filamentlänge von 9,3 μm in der einen Parasitenkultur, während eine andere Parasitenkultur eine Filamentlänge im Mittelwert von 21,7 μm aufwies. Dies entsprach einer Zunahme der Filamentlänge von über 200 % und verdeutlichte die Variabilität dieser dynamischen Strukturen. Zusätzliche Immunfluoreszenzstudien die unter der Leitung von Frau PD Dr. G. Pradel durchgeführt wurden, konnten darlegen, dass die Filamententwicklung in wildtypischen Parasitenkulturen von der Exposition von *Pfs25* und *Pfs230* auf der Filamentoberfläche nicht abhängt (Pradel *et al.*, in Revision). Dafür wurde die Ausbildung der Gametenfilamente unter Zugabe von Antiserum gegen *Pfs25* oder *Pfs230* analysiert. Die

Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass der prozentuale Anteil der filamentpositiven Zellen im Vergleich von zwei unabhängigen Quantifizierungen stark variieren kann. Somit wiesen Kontrollproben unter Einfluss von neutralem Mausserum in einer Quantifizierung einen Anteil von 42 % filamentbildender Zellfilamente auf, während eine andere Quantifizierung einen Anteil von 60 % filamentpositiver Zellen zeigte. Die untersuchte Filamentlänge in den wildtypischen Parasitenkulturen unter Einfluss von Antiserum zeigte ebenso eine starke Variation unter Einfluss von Antiserum. Dies verdeutlicht erneut den dynamischen Charakter der Ausbildung der Zellfilamente, und muss ebenfalls für die Quantifizierung des prozentualen Anteils filamentausbildender Zellen in KO-Parasiten im Vergleich zu wildtypischen Kulturen beachtet werden. Die Reduktion des prozentualen Anteils der Gametenfilamente in *PfCCp1*-, *Pfs230*- und *Pfs48/45*-KO-Parasiten könnte gegebenenfalls auf die natürlich schwankenden Verhältnisse von filamentausbildenden Zellen in Parasitenkulturen zurückzuführen sein und weniger auf das Fehlen dieser sexualstadienspezifischen Proteine.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse, dass die Filamentbildung in den untersuchten KO-Parasiten nicht blockiert ist, wurde durch die detaillierte Quantifizierung der Gametenfilamente in *PfCCp1*-, *PfCCp3*, *PfFNPA*-, *Pfs230(D2)* und *Pfs48/45*-KO-Parasiten verifiziert. Zusammengefasst lässt sich die Annahme formulieren, dass die untersuchten sexualstadienspezifische Proteine keine essentielle Voraussetzung für die Filamententbildung darstellen (Pradel *et al.*, in Revision).

4.2.2 Die Filamentmorphologie - Variationen eines neuen Phänomens

Das Erscheinungsbild der Filamente konnte unter anderem durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse detailliert betrachtet und beschrieben werden (Pradel *et al.*, in Revision). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Immunfluoreszenzstudien deckten auf, dass die Filamente überwiegend die Länge mehrerer Zelldurchmesser umfassten, was auf eine Länge im Mittelwert von ca. 47 μm eingegrenzt werden konnte. Die Spanne der Filamentlänge in wildtypischen Parasiten umfasste dabei 3-180 μm , wobei 50 % aller Filamente eine Länge zwischen 24 und 63 μm aufwiesen. Die anschließend erhobenen Daten unter der Leitung von Frau PD Dr. G. Pradel bezüglich der Filamentlänge von Wildtypparasiten und KO-Parasiten ergaben ein ähnliches Längenintervall von 2 μm bis maximal 180 μm , mit Mittelwerten der Filamentlänge zwischen 9 und 30 μm (Pradel *et al.*, in Revision). Der Großteil der in der Literatur beschriebenen Zellfortsätze besitzt eine Länge zwischen 10 und 140 μm . Der Durchmesser der hier beschriebenen Gametenfilamente konnte durch die rasterelektronenmikroskopische Analyse auf ca. 200 nm grob bestimmt werden (Pradel *et al.*, in Revision), was in Deckung zu bringen ist mit dem Durchmesser

zwischen 50 und 800 nm der bereits beschriebenen Zellausläufer anderer Zelltypen (Miller *et al.*, 1995; Önfelt *et al.*, 2004; Rustom *et al.*, 2004; Koyanagi *et al.*, 2005; Sherer *et al.*, 2007; Sowinski *et al.*, 2008; Gousset *et al.*, 2009). Die REM-Analyse stellte zudem heraus, dass bis zu neun am Ende geschlossene Zellfilamente und mehrere Zellfilamentansätze von Makrogameten gebildet werden können, die an umliegende Erythrozyten sowie Makrogameten adhären (Pradel *et al.*, in Revision). Das Vorkommen von am Ende geschlossenen membranösen Zellausläufern ist bereits für T-Zellen beschrieben worden (Sowinski *et al.*, 2008). Im Zuge dieser Arbeit durchgeführte Immunfluoreszenzstudien konnten die auffällige Klusterbildung der Makrogameten, die durch Filamente netzartig miteinander verbunden vorliegen, nachweisen. Die Zellkluster umfassten in Einzelfällen neben Makrogameten ebenso Zygoten und Gametozyten. Von Frau PD Dr. G. Pradel durchgeführte Immunfluoreszenzstudien konnten die beschriebenen Gametenfilamente auch ausgehend von Mikrogametozyten zeigen (Pradel *et al.*, in Revision).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen tubulären Filamente erschienen in der Immunfluoreszenzanalyse als geradlinige oder verzweigte Strukturen, die in periodischen Intervallen von knotenartigen Verdickungen unterbrochen sind. Derartige vergleichbare Auswölbungen entlang der Zellausläufer ist ein Merkmal, das in einigen beschriebenen membranösen Zellkonnektiven beobachtet worden ist (Miller *et al.*, 1995; Galkina *et al.*, 2001; Raghunathan *et al.*, 2001; Önfelt *et al.*, 2004; Rustom *et al.*, 2004). Mit Hilfe von REM-Untersuchungen konnte die auffällig perlschnurartig erscheinende Struktur der Makrogametenfilamente aufgedeckt werden, wobei hierbei lediglich nicht-verzweigte Filamente zu beobachten waren (Pradel *et al.*, in Revision). Ergebnisse von TEM-Untersuchungen an den Filamenten, die von Frau PD Dr. G. Pradel und Frau L. Sologub durchgeführt wurden, konnten nachweisen, dass die Oberfläche der Filamente in periodischen Abständen mit proteinreichem Material bedeckt ist. Diese Proteinakkumulation könnte der Grund für die periodischen Auswölbungen der Gametenfilamente sowie deren perlschnurartiges Erscheinungsbild sein.

Die Analyse der Gametenfilamente an lebenden Parasiten zeigte deren nicht-verzweigte Struktur und Länge von bis zu 100 µm auf. Auffällig dabei war, dass die Filamente ebenso an umliegende, mit asexuellen Parasiten infizierte Erythrozyten adhären können. Der Einsatz des Farbstoffes LysoTracker und die Untersuchung an episomal GFP-exprimierenden Parasitenlinien zeigten, dass die am Ende geschlossenen Gametenfilamente mit zytoplasmatischem Inhalt gefüllt sind und mehrere Filamente oder Filamentansätze von vitalen Makrogameten ausgebildet werden können (Pradel *et al.*, in Revision). Dieses Ergebnis wird von Untersuchungen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Doerig, Glasgow/Lausanne, bestätigt, die ebenfalls die Ausbildung von Filamenten GFP-exprimierenden Parasiten (Reininger *et al.*, 2009) beobachten konnten. Die dabei

Diskussion

verwendete Zelllinie exprimiert das GFP-Protein episomal als Fusionsprotein mit der Kinase *Pfnek2* (*Nima-related protein kinase 2*). Die Hypothese der zytoplasmagefüllten Gametenfilamente wurde in der vorliegenden Arbeit vor allem durch den Nachweis der Akkumulation von GFP in der löslichen Zellfraktion der GFP-exprimierenden Parasitenlinie 5'CAM.GFP bestärkt. Es ist bekannt, dass die Löslichkeit von rekombinant hergestelltem GFP variabel sein kann (Siemering *et al.*, 1996). Die Transfektion von GFP-Reporterkonstrukten in *P. falciparum* konnte eine homogene GFP-Färbung intrazellulärer Parasitenstadien beweisen (VanWye & Haldar, 1997). VanWye & Haldar formulierten aufgrund dieser Untersuchungen die Annahme, dass GFP im Zytoplasma vorliegt (1997). In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Western-Blot-Studien detektierten GFP hauptsächlich in der hydrophilen, zytoplasmatischen und nur in geringem Umfang in der nicht-löslichen, membranangereicherten Zellfraktion von 5'CAM.GFP-Parasiten. Die Detektion von GFP in der hydrophoben Zellfraktion ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf Zytoplasmarrückstände zurückzuführen, und lässt weniger auf eine Assoziation von GFP mit Membranen in dieser Parasitenlinie schließen. Die Annahme der zytoplasmagefüllten Gametenfilamente wird durch von Frau PD Dr. G. Pradel und Frau L. Sologub durchgeführte transmissionselektronenmikroskopische Analysen gestützt (Pradel *et al.*, in Revision). Die REM- sowie TEM-Untersuchungen konnten zudem eine Verwechslung der Filamente mit den strukturell deutlich zu unterscheidenden Mikrogameten ausschließen.

Die Ergebnisse über das Erscheinungsbild der Gametenfilamente variierten je nach Art der angewandten Untersuchungsmethodik gering. Dies lässt sich unter anderem auf die unterschiedlichen Präparationsmethoden zurückführen, die sich beispielsweise im Falle von Immunfluoreszenzstudien und REM-Analysen deutlich unterscheidet. Für Immunfluoreszenzstudien wurden die aktivierten Gametozyten aus dem Reagiergefäß auf die Objektträger dünn aufgebracht und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Proben Methanol-fixiert. Dies stellt eine recht harsche Fixierungstechnik im Gegensatz zu den in-Lösung-fixierten Proben der REM-Analyse dar. Das besondere an der REM-Analyse ist die Erhaltung der dreidimensionalen Struktur des zu untersuchenden Objektes. Um dies zu gewährleisten, wurden die aktivierten Gametozyten in der sie umgebenden Mischung aus Medium und Aktivierungslösung mit Glutaraldehyd fixiert und niemals der Luft ausgesetzt. Die Lufttrocknung kann zu einer Veränderung der Morphologie eines biologischen Präparates führen. Die Untersuchung der Gametenfilamente an lebenden Parasiten ohne eine Fixierung stellt die bevorzugte Analysemethodik dar, um die Gametenmorphologie so genau wie möglich beschreiben zu können. Wichtig ist in diesem Zusammenhang zu nennen, dass eine einzige Technik für die Darstellung und Beschreibung eines biologischen Phänomens nicht ausreichend ist. Biologische Präparate verhalten sich auffällig unterschiedlich unter Einfluss verschiedener Fixierungs- und Analysemethoden. Somit

lassen sich die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zusammengefaßt interpretieren, um ein Gesamtbild der tatsächlich vorliegenden Filamentmorphologie zu erhalten. Eine Technik allein reicht nicht aus, um die Natur der Gametenfilamente erfassen zu können. Die Interpretation der Klusterbildung von Makrogameten unter Beteiligung von Zygoten und Gametozyten aufgrund von zweidimensionalen Immunfluoreszenzstudien sollte ebenso durch die Anwendung anderer Mikroskopietechniken vervollständigt werden. Dies könnte z.B. die hochauflösende Rasterkraftmikroskopie sein, bei der die untersuchten Proben ohne Fixierung sowie in-Lösung visuell dargestellt werden können (Eibl & Moy, 2005).

4.2.3 Die Biogenese: die Filamente als Ausläufer der parasitären (Gameten-) Plasmamembran

Der Zeitpunkt der Filamentbildung konnte näher bestimmt werden. Erstaunlicherweise deckten die Ergebnisse auf, dass bereits fünf Minuten nach der Gametozytenaktivierung ein Anteil von ca. 33 % der Makrogameten Filamente ausgebildet haben. Bereits 15 Minuten nach der Aktivierung der Gametozyten stieg der Anteil der filamentpositiven Makrogameten auf über 67 % an. Die Filamente blieben an über 70 % der Makrogameten eine Stunde nach der Gametozytenaktivierung erhalten. Zusätzliche Immunfluoreszenzstudien die unter der Leitung von Frau PD Dr. G. Pradel durchgeführt wurden, untersuchten ebenfalls den Anteil der filamentbildenden Makrogameten. Die Untersuchungen konnten im Gegensatz dazu einen Anteil von ca. 50 % der filamentpositiven Gameten eine Stunde nach der Gametozytenaktivierung belegen (Pradel *et al.*, in Revision). Zwei Stunden nach der Gametozytenaktivierung wurde der Anteil der filamentpositiven Zellen auf über 60 % bestimmt. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Filamente bis zu 12 Stunden nach der Gametozytenaktivierung detektiert werden können. Die Berücksichtigung der Tatsache, dass Makrogameten nach Aktivierung ca. zehn Minuten brauchen, um aus der Wirtszelle auszubrechen (Pradel, 2007) bedeutet, dass die Bildung der Filamente startet, bevor der Makrogamet komplett aus dem Erythrozyten ausgebrochen und für eine Befruchtung zugänglich ist (Pradel *et al.*, in Revision). Nicht befruchteten Makrogameten wird keine weitere Funktion im Mitteldarm der Stechmücke zugesprochen. Die Gametenfilamente persistieren dennoch weit über das Ereignis der Befruchtung hinaus, welches nach 15 bis 20 Minuten abgeschlossen ist (Billker *et al.*, 2004). Dies steht in starkem Kontrast zu den von Rustom *et al.* als fragil und unter anderem lichtempfindlich beschriebenen Zellfilamenten von neuronalen Rattenzellen (2004). Die Filamente der Makrogameten in *Plasmodium* konnten dagegen auch 12 Stunden nach der Aktivierung der Gametozyten und damit Beginn der Filamentbildung noch fixiert und für Immunfluoreszenzstudien aufbereitet werden. Die Exposition membranöser Zellausläufer für

Diskussion

mehrere Stunden konnte in anderen Zelltypen ebenso demonstriert werden (Lehmann *et al.*, 2005; Önfelt *et al.*, 2006; Sherer *et al.*, 2007). Wichtig ist in diesem Zusammenhang zu nennen, dass neben Makrogameten ähnliche filamentöse Strukturen ausgehend von Zygoten entdeckt werden konnten. Immunfluoreszenzstudien die von Frau Dr. G. Pradel und Frau L. Sologub durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass die Filamentoberfläche nicht mit dem sexualstadienspezifischen Protein *Pfs28* assoziiert vorliegt (Pradel *et al.*, in Revision). *Pfs28* wird auf der Oberfläche von Makrogameten, Zygoten und Ookineten exprimiert (Duffy & Kaslow, 1997). Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass die Filamente in sich entwickelnden Gameten bereits während des Abrundens gebildet werden, und als rudimentäre Strukturen mit der Oberfläche der Zygoten assoziiert bleiben. Einen wichtigen Hinweis in diesem Zusammenhang liefert die Hypothese, dass die Translation der Transkripte für *P25* und *P28* in Gametozyten blockiert und erst im Zuge des Makrogametenausbruchs aus der Wirtszelle aufgehoben wird (Billker *et al.*, 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass die entsprechenden Transkripte in Makrogametozyten unter der Kontrolle der Translations-unterdrückenden RNA-Helikase DOZI (*development of zygote inhibited*) stehen (Mair *et al.*, 2006). Da für *Pfs25* allerdings eine Expression in bereits nicht-aktivierten Gametozyten nachgewiesen werden konnte (Scholz *et al.*, 2008), kann diese Blockierung der Translation für *Pfs25* nicht absolut sein. Dies bedeutet möglicherweise, dass zeitgleich mit der Aktivierung der Gametozyten die parasitäre *Pfs25*-positive Plasmamembran die Filamente ausbildet. Da die Expression bzw. Translation der mRNA von *Pfs28* erst später einsetzt, wird dieses Protein vorerst nicht mit den Zellausläufern verknüpft. Zukünftige Studien könnten diese Annahme klären, indem die Membrankomponenten der Filamente näher untersucht werden. Dies könnte beispielsweise unter Einsatz von fluoreszenzgekoppelten Ceramiden untersucht werden. Zusätzlich deckten von Herrn cand. biol. F. Kohlhepp durchgeführte Immunfluoreszenzstudien auf, dass Filamente auf Retortenstadien im Mitteldarm der Stechmücke vorhanden sein können (Pradel *et al.*, in Revision). Diese können höchstwahrscheinlich ebenso wie bei den Zygotenfilamenten als rudimentäre Strukturen betrachtet werden, da die aktive Bildung der Filamente bisher nur bei Gameten beobachtet worden ist. Ookineten bilden keine filamentösen Zellausläufer aus.

Die Assoziation der Gametenfilamente mit wichtigen sexualstadienspezifischen Proteinen lieferte den Grundstein für die Annahme, dass die Filamente Ausläufer der Gametenmembran darstellen. Um dies zu untermauern, wurden Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung von Antiserum gegen das Protein *Pfs16* durchgeführt. *Pfs16* ist lokalisiert in der PVM, innerhalb der Nahrungsvakuole sowie in spaltenartigen Strukturen des Zytoplasmas der Wirtszelle (Baker *et al.*, 1994; Lanfrancotti *et al.*, 2007) und kann somit als Marker für die PVM eingesetzt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass *Pfs16* nicht mit der Filamentoberfläche assoziiert ist und führten zu der Annahme, dass die PVM nicht an der

Diskussion

Biogenese der Filamente beteiligt ist. Immunfluoreszenzstudien die unter der Leitung von Frau PD Dr. G. Pradel durchgeführt wurden, detektierten rudimentäre Reste *Pfs16*-positiver Membranfragmente in Assoziation mit der Oberfläche aktivierter Gametozyten. Um zu verifizieren, dass die PVM nicht an der Filamentbildung der Gameten beteiligt ist, wurden Immunfluoreszenzstudien unter Einsatz von Antiserum gegen das Protein Exp-1 als spezifischer Marker der PVM (Günther *et al.*, 1991; Ansorge *et al.*, 1997) durchgeführt. Die erlangten Daten verifizierten die Hypothese, dass die PVM nicht an der Bildung der Gametenfilamente beteiligt ist (Pradel *et al.*, in Revision).

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich Studien durchgeführt, die die Filamentbildung nach vorangehender Lyse der Wirtszellmembran unter Einsatz von Saponin untersuchten. Die parasitophore Vakuolenmembran bildet sich nach der Wirtszellinvasion um den Parasiten. Es konnte gezeigt werden, dass in die PVM sowohl parasitäre (Simmons *et al.*, 1987; Ansorge *et al.*, 1997; Spielmann *et al.*, 2003) als auch erythrozytäre Proteine (Lauer *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2004) inkorporiert werden. Für die mit den Filamenten assoziierten sexualstadienspezifischen Proteine *Pfs230*, *Pfs25*, *Pfs48/45* und *PfCCp4* ist keine Assoziation mit der PVM oder der Erythrozytenmembran bekannt. Die Inkubation von parasitierten Erythrozyten mit Saponin resultiert in der Lyse der PVM sowie der Erythrozytenmembran (Ansorge *et al.*, 1996). Immunfluoreszenzstudien unter Einsatz von Antiserum gegen *Pfs25* zeigten, dass die Ausbildung der Filamente durch die Inkubation aktivierter Gametozyten mit Saponin nicht beeinträchtigt wird (Pradel *et al.*, in Revision). Zusätzlich wurden unter der Leitung von Frau PD Dr. G. Pradel Immunfluoreszenzstudien durchgeführt, die unter Einsatz von Antiserum gegen Band 3 als integrales Protein der Erythrozytenmembran (Kopito & Lodish, 1985) zeigten, dass die Filamente nicht von der Erythrozytenmembran gebildet werden. Diese Ergebnisse unterstützen zusammengenommen die dass weder die parasitophore Vakuolenmembran noch die Wirtszellmembran an der Ausbildung der Gametenfilamente beteiligt ist

Für Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass eine zelluläre Membranausstülpung in einer Spannung der Plasmamembran resultiert, der durch eine Verschmelzung interner Membranvorräte mit der äußeren Plasmamembran entgegenwirkt werden kann (Raucher & Sheetz, 1999). Aufgrund der Tatsache, dass sich die Gametenfilamente bereits fünf Minuten nach der Aktivierung der Gametozyten ausgebildet haben, könnte ein gametozyteninternes Membranreservoir vermutet werden, das die rapide Ausbildung der extrem langen membranösen Zellfortsätze gewährleisten könnte.

Für die Entstehung ähnlicher Zellfilamente bei anderen Organismen wurden bisher zwei Modelle postuliert: entweder die membranösen Zell-Zellverbindungen werden *de novo* durch eine aktive, aktinabhängige Bewegung ausgebildet oder sie bleiben nach einem physischen Kontakt zweier Zellkörper zurück (Davis & Sowinski, 2008; Sherer & Mothes 2008). Die

Fragestellung, ob die Zellfilamentbildung bei *Plasmodium* von Zellkontakten abhängig ist, untersuchten Immunfluoreszenzstudien die unter der Leitung von Frau PD Dr. G. Pradel durchgeführt wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung der Gametenfilamente von der Anzahl der sie umgebenden aktivierten Gametozyten unabhängig ist (Pradel *et al.*, in Revision). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Gametenfilamente bei *Plasmodium* aktiv ausgebildet werden und nicht aufgrund eines sich lösenden Zell-Zellkontaktes aus der Oberfläche der Gameten austreten. Zusätzlich dazu wurden Immunfluoreszenzen durchgeführt, die die Filamentbildung in aktivierten Gametozytenkulturen untersuchten, in denen die oberflächenständigen Glycophorine der Erythrozyten unter Einsatz von Chymotrypsin entfernt wurden. Die Filamentbildung unterschied sich in den Chymotrypsin-behandelten Proben nicht von unbehandelten Proben (Pradel *et al.*, in Revision). Die Ergebnisse dieser Analysen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Ausbildung der Gametenfilamente in *Plasmodium* von der Adhäsion an umliegende Erythrozyten sowie aktivierte Gametozyten unabhängig ist.

4.2.4 Die Evaluation von an der Filamentbildung beteiligten Zytoskelettkomponenten unter Einsatz von Inhibitoren

Die in dieser Arbeit generierten Daten umfassten ebenso die Untersuchung der Filamente in Hinblick auf damit assoziierte Zytoskelettkomponenten. Frühere Studien konnten belegen, dass in höheren eukaryotischen Zellen ähnliche Zellausläufer typischerweise mit F-Actin und nur in seltenen Fällen zusätzlich mit Mikrotubuli assoziiert vorliegen (Davis & Sowinski, 2008; Gerdes & Carvalho, 2008). Weiterhin kodiert das Genom von *P. falciparum* für zwei unterschiedliche Aktin Gene: *Pfact1* (PFL2215w) und *Pfact2* (PF14_0124; Wesseling *et al.*, 1988). Während *Pfact1* im gesamten Zyklus von *P. falciparum* exprimiert wird, weist *Pfact2* eine sexualstadienspezifische Expression auf (Wesseling *et al.*, 1989; Schüler & Matuschewski, 2006).

In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass Aktin- und Tubulininhibitoren in einer Konzentration von 50 nM die Mikrogametozytenexflagellation vollständig hemmen sowie die Ausbildung der Filamente in Makrogameten signifikant reduzieren. Die Analyse zeigte eine deutliche Reduktion der filamentpositiven Makrogameten um ca. 30 % unter Einfluss des Aktininhibitors Cytochalasin B bzw. um ca. 23 % unter Einfluss des Tubulininhibitors Colchicin im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen.

Cytochalasin B ist eine aus *Drechslera* gewonnene zellpermeable Substanz, die einen Einfluss auf eine Reihe biologischer Zellprozesse ausübt. Darunter fällt beispielsweise die Inhibition kontraktile Mikrofilamente (Carter, 1967; Krishan, 1972). Zudem ist die Hemmung der Glukose-Aufnahme bewiesen worden (Kletzien *et al.*, 1972; Mizel & Wilson, 1972). Die

Diskussion

Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien ist mit der Polymerisation von Aktin, der Aktivierung des Motorproteins Myosin und dem Zusammenbau von Aktinbündeln und -Netzwerken verknüpft (Lodish *et al.*, 2004a). Es wird angenommen, dass Cytochalasin B die Addition von Aktin-Monomeren an wachsende Aktin-Filamente blockiert. Colchicin ist ein Pflanzenalkaloid und bekannt als Mitose-Inhibitor (Desai & Mitchison, 1997). Die Polymerisation von Mikrotubuli wird durch Colchicin über dessen Bindung an $\alpha\beta$ -Tubulin Dimere verhindert (Lodish *et al.*, 2004b). Das Axonem von Mikrogameten weist ebenso wie die Axoneme von Cilien und Flagellen die typische 9+2 Struktur der polymerisierten Mikrotubuli auf (Pradel, 2007). Die Bewegung von Cilien und Flagellen erfolgt allgemein über die Interaktion von Mikrotubuli-Dupletten mit dem Motorprotein Dynein.

Bei *Plasmodium* umfasst der Prozess der Exflagellation drei nacheinander ablaufende Replikationen, gefolgt von drei rapide ablaufenden Teilungen des Chromosomensatzes (8n). Es bildet sich je ein Axonem pro sich entwickelndem Mikrogameten aus, insgesamt acht Axoneme pro Mikrogametozyt. Ein haploider Chromosomensatz wird direkt nach der Entstehung mit einem Axonem verknüpft (Sinden *et al.*, 1976). Die Axoneme werden im Laufe der Exflagellation unterhalb der Plasmamembran der Mikrogametozyten ausgestoßen und bilden die noch am Mikrogametozyten anheftenden Mikrogameten. Die in dieser Arbeit dargestellte Hemmung der Exflagellation unter Einfluss von Colchicin ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Inhibition der Mikrotubulipolymerisation zurückzuführen. Sich entwickelnde Mikrogameten würden damit in der Entwicklung gestoppt werden, was wiederum zu einer Reduktion der beobachteten Exflagellationszentren führen würde. Dieses Ergebnis wird durch Daten von Studien unterstützt, die ebenfalls die Inhibition der Mikrogametozytenexflagellation unter Einfluss von Colchicin und Cytochalasin B darlegen konnten (Toyé *et al.*, 1977; Sinden *et al.*, 1985). Sinden *et al.* stellten Hypothesen über Wirkungsmechanismen für die beiden Zytoskelett-Inhibitoren auf (1985). Demnach wird angenommen, dass Colchicin die Polymerisation intranukleärer sowie zytoplasmatischer Mikrotubuli inhibiert und dadurch die vollständige Segregation des oktaploid vorliegenden Chromosomensatzes hemmt. Die Hemmung der Mikrogametozytenexflagellation unter Einfluss von Cytochalasin B erklärten die Autoren dadurch, dass die Organisation und Aufrechterhaltung der Struktur des Spindelapparates und damit die essentielle Teilung des Chromosomensatzes im Zuge der Mikrogametogenese die Interaktion von Aktin-Myosin-Komplexen erfordert.

Eine Hemmung der Exflagellation männlicher Gameten lässt *per se* zwar auf eine Hemmung der Ausbildung der Filamente bei Mikrogametozyten aber nicht bei Makrogameten schließen. Die Ausbildung der Filamente wurde jedoch ausschließlich bei Makrogameten untersucht. Aus diesen Ergebnissen lassen sich verschiedene Annahmen schlussfolgern. Einerseits wäre es möglich, dass die Exflagellation der männlichen Gameten direkt mit der Ausbildung

Diskussion

von Makrogametenfilamenten gekoppelt ist. Ohne eine Exflagellation könnten somit in der weiblichen Gametogenese involvierte Prozesse wie die Ausbildung von filamentösen Zellausläufern nicht vollständig ablaufen. Ob die Makrogametenfilamente eine wichtige Rolle in der anschließenden Befruchtung spielen (siehe 4.2.4), ließe sich unter anderem durch eine Analyse des Anteils der unter dem Einfluss der Zytoskelett-Inhibitoren gebildeten Zygoten ermitteln. Dies könnte mittels weiterer Immunfluoreszenzstudien erfolgen, die das Kernmaterial der abgerundeten Zellen unter Einsatz von 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) oder *Hoechst Nuclear Stain* hervorheben. Ein derart markierter Zygotenzellkern erscheint aufgrund des diploid vorliegenden Kernmaterials im Gegensatz zu dem haploiden Chromosomensatz von Gameten vergrößert. Alternativ ließe sich der Zygotenanteil in nicht-fixierten Proben über den Einsatz von *bisBenzimide H* untersuchen, da diese Substanz im Gegensatz zu z.B. DAPI nur eine geringe Zytotoxizität auf die Zellen ausübt. Die naheliegendste Schlussfolgerung aus den Daten ist jedoch, dass die Hemmung der Mikrogametozytenexflagellation keinen Einfluß auf die Bildung der Makrogametenfilamente ausübt und die beiden inhibierten Ereignisse als getrennte Ergebnisse voneinander betrachtet werden müssen. Dafür spricht die Tatsache, dass die Mikrogametozytenexflagellation vollständig gehemmt werden konnte, die Ausbildung der Filamente jedoch nicht. Möglicherweise bedeutet dies, dass die Hemmung der Filamententwicklung auf durch die Inhibitoren gestörte Zellprozesse zurückzuführen ist, die nicht direkt mit den Filamenten gekoppelt sind. Es ist bekannt, dass die Zytoskelett-Inhibitoren mit einer Vielzahl fundamentaler Prozesse innerhalb der Zelle interferieren können. Darunter fällt unter anderem die Sekretion eukaryotischer Zellen und die Präzipitation von Membranproteinen (Grenier *et al.*, 1975; Malaisse *et al.*, 1975; Luduena, 1979).

Ob die Exflagellation der männlichen Gameten tatsächlich die Entwicklung der beschriebenen Zellausläufer beeinflusst, könnte durch eine Hemmung der Exflagellation mittels anderer Substanzen aufgeklärt werden. Dabei könnten z.B. die in dieser Arbeit verwendeten Protease-Inhibitoren eingesetzt werden. Protease-Inhibitoren mit einem relativ niedrigen IC_{50} -Wert wie TLCK (12,6 μ M), TPCK (16,1 μ M) oder 1,10-Phenanthrolin (33,2 μ M) würden sich für diese Experimente anbieten. Die anschließende Auswertung des Anteils der filamentpositiven Makrogameten mittels Immunfluoreszenzstudien würde einen möglichen Zusammenhang zwischen der Mikrogametozytenexflagellation und der Filamententwicklung aufklären.

Für das *Phylum* der Apikomplexa konnte gezeigt werden, dass der Hauptteil von Aktin als monomere Form und nicht polymerisiert als filamentöses Aktin vorliegt (Cintra & De Souza, 1985; Dobrowolski *et al.*, 1997). Frühere Studien konnten belegen, dass Mikrofilamente in *T. gondii* und *P. yoelii* nicht durch die Anwendung klassischer Techniken wie

Elektronenmikroskopie und alleinige Fluoreszenzmarkierung mittels Phalloidin sichtbar gemacht werden können (Cintra & De Souza, 1985; Gantt *et al.*, 2000). Phalloidin ist eine aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) isolierte Substanz und wirkt als starker Aktin-Inhibitor. Dabei stabilisiert Phalloidin filamentöses Aktin und verhindert eine Depolymerisation (Cooper, 1987). Phalloidin wird als Fluoreszenz-Derivat üblicherweise in der Forschung zur Markierung von Aktin-Filamenten verwendet. Eine besondere Eigenschaft der Aktin-Filamente in *Plasmodium* ist, dass sie extrem kurz erscheinen und dadurch schwer detektierbar sind (Schüler *et al.*, 2005; Schüler & Matuschewski, 2006). Schüler *et al.* nutzten daher Phalloidin als Aktinstabilisator und konnten rekombinantes Aktin an Phalloidin gebunden darstellen (2005). Analog dazu wurde in der vorliegenden Arbeit Aktin durch die Inkubation von Gametozytenkulturen mit 1 μ M TRITC-Phalloidin stabilisiert. Die Assoziation von Aktin mit den Gametenfilamenten konnte anschließend in Form von *Pfact2* durch die Anwendung von Immunfluoreszenzstudien dargestellt werden (Pradel *et al.*, in Revision). Eine Verknüpfung der Filamente mit alpha-tubulin konnte hingegen nicht festgestellt werden. Immunfluoreszenzstudien die von Frau Dr. G. Pradel und L. Sologub durchgeführt wurden untersuchten zusätzlich, ob das männlich-exprimierte Protein *Pfalpha-tubulinII* mit den Gametenfilamenten verknüpft ist. *Pfalpha-tubulinII* wird in männlichen Gametozyten ab Stadium III und in Mikrogameten exprimiert (Rawlings *et al.*, 1992). Das Protein wird in Verbindung mit dem Axonem gebracht, was die spezifisch männliche Expression erklärt. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzstudien konnten jedoch keine Assoziation von *Pfalpha-tubulinII* mit den Gametenfilamenten nachweisen (Pradel *et al.*, in Revision).

Der Großteil der in der Literatur beschriebenen membranösen Zellausläufer ist mit Aktin verbunden (Miller *et al.*, 1995; Rustom *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2005; Önfelt *et al.*, 2006; Sherer *et al.*, 2007; Sowinski *et al.*, 2008; Bukoreshtliev *et al.*, 2009). Zudem wurde postuliert, dass artifiziell generierte Membranfortsätze keine Zytoskelettkomponenten enthalten, während natürlich entstandene Zellausläufer immer Aktin enthalten (Davis & Sowinski, 2008). Lediglich zwei Studien postulierten die Assoziation der Zellausläufer unter anderem mit Mikrotubuli (Gustafson & Wolpert, 1967; Önfelt *et al.*, 2006). Rustom *et al.* bedienten sich bei der Analyse der Zellausläufer in neuronalen Rattenzellen dem Aktin-Inhibitor Latrunculin B. Diese Substanz depolymerisiert filamentöses Aktin und zerstört die zelluläre Organisation der Mikrofilamente (Coué *et al.*, 1987; Spector *et al.*, 1989). Es konnte gezeigt werden, dass die beschriebenen Zellausläufer unter Einfluss von Latrunculin B nicht mehr gebildet werden (Rustom *et al.*, 2004). Zusätzlich konnten innerhalb der Membranfortsätze Myosin-verknüpfte Mikrovesikel sowie die Markierung der Fortsätze mit TRITC-Phalloidin nachgewiesen werden. Die Autoren der Studie postulierten demnach einen aktinabhängigen Organellentransportmechanismus als mögliche Funktion der membranösen Interkonnektive. Önfelt *et al.* konnten beweisen, dass humane Makrophagen zwei

verschiedene Arten von Zellfilamenten ausbilden können (2006). Die strukturell unterschiedlichen Filamenttypen zeichneten sich durch die Assoziation mit Aktin ('dünne' Membranfortsätze) bzw. mit sowohl Aktin als auch Tubulin aus ('dicke' Membranfortsätze). Die Verknüpfung der Mikrofilamente und Mikrotubuli mit den Zellausläufern konnte unter Einsatz von fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin bzw. eines monoklonalen Antikörpers gegen *alpha*-tubulin gezeigt werden. Dieselbe Studie konnte ebenfalls nachweisen, dass der interzelluläre Organellentransfer von Colchicin inhibiert werden kann. Önfelt *et al.* postulierten daraufhin, dass membranösen Zellausläufern unterschiedlicher Struktur auch unterschiedliche Funktionen zugesprochen werden können (2006).

Die in dieser Arbeit generierten Daten deuten zusammenfassend auf eine direkte Verknüpfung von Aktin mit den Filamenten hin. Der Einsatz von Aktin- und Tubulininhibitoren zeigte, dass sowohl die Mikrogametozytenexflagellation als auch die Bildung der Makrogametenfilamente biologische Prozesse sind, die die Polymerisation von sowohl Aktin als auch Tubulin benötigen.

4.2.5 Von der Untersuchung lebender Gameten zu der Formulierung einer möglichen Funktion der Gametenfilamente

Die Untersuchung von lebenden Gameten die mit dem Farbstoff LysoTracker markiert wurden deckte auf, dass die Makrogametenfilamente aktiv zum Zellkörper eingezogen werden können (Pradel *et al.*, in Revision). Eine Entfaltung der Filamente konnte dagegen nicht beobachtet werden. In dem beschriebenen Fall wurde der aktive Einzug des Zellfilaments ca. drei Stunden nach der Aktivierung der Gametozytenkultur beobachtet. Dieser Vorgang dauerte ca. 37 Minuten und konnte deutlich von passiven Bewegungen unterschieden werden, die in den Präparaten im Laufe von mikroskopischen Analysen auftreten. Studien an Zellfilamenten die im Laufe der Embryogenese des Seeigels (*Lytechinus*) auftreten, beschrieben ebenso den Einzug ähnlicher Zellfilamente (Miller *et al.*, 1995). Die Geschwindigkeit dieser aktiven Bewegung wurde dabei auf 10 $\mu\text{m}/\text{Minute}$ bestimmt. Das in dieser Arbeit aktiv eingezogene Zellfilament besaß eine Länge von ca. 25 μm und wurde mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,68 $\mu\text{m}/\text{Minute}$ eingezogen. Dies liegt deutlich unter der Geschwindigkeit des Filamenteinzugs aus *Lytechinus*. Die Analyse lebender Gameten unter Einsatz von LysoTracker konnte weiterhin die auffällige Klusterbildung der filamentbildenden Makrogameten ca. 12 Stunden nach der Aktivierung der Gametozytenkultur darlegen. Dies bestätigt die beobachtete Klusterbildung aus vorangehenden Immunfluoreszenzstudien.

Die Untersuchung lebender filamentausbildender Makrogameten umfasste ebenso die Analyse des Mitteldarminhalts von *A.-stephensi*-Stechmücken. Die Aktivierung einer

Diskussion

Stadium-V-Gametozytenkultur wurde in diesem Fall nicht artifiziell über die Inkubation mit Aktivierungslösung herbeigeführt, sondern erfolgte über die Aktivierung im Mitteldarm der Stechmücke. Es konnte ohne Einsatz eines Farbstoffes o.ä. ein lebender Makrogamet im Hellfeld beobachtet werden, der zwei lange filamentöse Zellfortsätze aufwies. Die Untersuchung von fixiertem Mitteldarmmaterial von Stechmücken unter Einsatz von Immunfluoreszenzstudien bewies ebenfalls, dass 'natürlich' generierte und aktivierte Makrogameten in der Lage sind, die beschriebenen Zellfortsätze auszubilden (Pradel *et al.*, in Revision). Die Entwicklung der Gametenfilamente als *in-vitro*-Kultivierungsartefakt wurde zusätzlich durch Immunfluoreszenzstudien, die von Frau MSc S. Agarwal durchgeführt wurden, widerlegt. Dabei konnte die Ausbildung der Filamente in einem erst vier Monate lang kultivierten *Plasmodium-falciparum*-Feldisolat beobachtet werden (Pradel *et al.*, in Revision). Ob den Filamenten eine Rolle im interzellulären Austausch von Zytosolmaterial zugesprochen werden kann, wurde durch die Vermischung und Inkubation von zwei unterschiedlich gefärbten Populationen aktivierter Gametozytenkulturen verifiziert. Ein Austausch der unterschiedlichen Farbstoffe konnte über einen Zeitraum von 12 Stunden nicht beobachtet werden (Pradel *et al.*, in Revision). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den REM- und TEM-Daten zu bringen, aufgrund derer die Annahme formuliert worden ist, dass die Filamente am Ende geschlossen sind und nicht als interzelluläre Kommunikationsbrücke fungieren.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse konnten unter Berücksichtigung der angeführten und veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Studien darlegen, dass die Gametenfilamente bei *P. falciparum* typische Charakteristika der in der Literatur beschriebenen Zell-Zellverbindungen aufweisen (vergleiche Tabellen 1.2 und 4.1).

Tabelle 4.1. Zusammenfassung der wichtigsten Zellfilamentcharakteristika der in dieser Arbeit beschriebenen membranösen Zellausläufer.

Morphologie	Cargo und Transport	Besonderheit	Mögliche Funktionen
Ø ca. 200 nm und Länge zwischen 3-180 µm verzweigt oder nicht verzweigt am Ende geschlossen in periodischen Abständen von beulenartigen Auswölbungen unterbrochen	mit zytoplasmatischen Komponenten befüllt kein Austausch von zytosolischem Material	Aktin-assoziiert, Bildung im Laufe der Gametogenese robust und beständig Exposition bis zu mindestens 12 Stunden	Herstellung eines physikalischen Zellkontaktes

Zusammenfassend lässt sich eine putative Funktion der Gametenfilamente in *P. falciparum* formulieren. Die hier dargestellten sowie diskutierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Filamente aufgrund ihrer adhäsiven Eigenschaften im Mitteldarm der Stechmücke auftreten. Möglicherweise bedienen sich vitale Gameten dieser Instrumente, um andere Sexualstadien im Mitteldarm der Stechmücke zu finden und/oder zu verbinden (Pradel *et al.*, in Revision). Die auffällige Klusterbildung der Filament- und PfCCp4-positiven Gameten ist zusammen mit der Tatsache, dass Gameten die einzigen Zellen im *Plasmodium*-Lebenszyklus sind, die miteinander 'kommunizieren' und interagieren müssen, der stärkste Hinweis auf diese Hypothese. Den bisher in der Literatur beschriebenen Zellfortsätzen ist eine Reihe unterschiedlicher Funktionen zugeordnet worden, die die Heterogenität dieses neuartig beschriebenen Phänomens widerspiegeln (Davis & Sowinski, 2008; Gerdes & Carvalho, 2008; Sherer & Mothes 2008). Die für viele der Zellausläufer postulierte Funktion der interzellulären Signalübertragung trifft jedoch höchstwahrscheinlich nicht auf die in dieser Arbeit beschriebenen Filamente zu. Die hier gezeigten *Plasmodium*-Zellausläufer können in ihrer vermuteten Funktion eher mit Zellausläufern verglichen werden, die von Neutrophilen, dendritischen Zellen und T-Zellen ausgebildet werden. Neutrophilen-Zellausläufern wurde unter anderem eine Rolle bei der Adhäsion und Bindung von weit entfernten Objekten zugesprochen (Galkina *et al.*, 2001; Galkina *et al.*, 2005). Eine analoge Funktion wurde Zellausläufern von dendritischen Zellen zugewiesen, die dadurch die Effizienz steigern könnten, eine passende T-Zelle zur Antigen-Präsentation zu lokalisieren (Raghunathan *et al.*, 2001). Die Herstellung eines interzellulären physikalischen Zellkontaktes durch am Ende geschlossene Membranausläufer konnte ebenso für T-Zellen dargestellt werden (Sowinski *et al.*, 2008). Neben den in dieser Arbeit beschriebenen *Plasmodium*-Zellausläufern konnten ähnliche Strukturen bei *Shewanella oneidensis* gezeigt werden (Gorby *et al.*, 2006). Die Ausbildung von sehr dünnen und langen membranösen interzellulären Brücken stellt möglicherweise ein sehr früh in der Evolution auftretendes Phänomen dar. Die Entdeckung und Beschreibung von ähnlichen neuartigen Zell-Zellausläufern in weiteren Zelltypen und Organismen könnte die Variation ihrer Funktion noch erweitern. Die Beschreibung der Zellfilamente bei *P. falciparum* leistet zumindest einen gewichtigen Beitrag für die vollständige Aufklärung der Sexualphase dieses humpathogenen Erregers, und lässt damit die Entwicklung neuer Strategien für die Bekämpfung von Malaria deutlich näher rücken.

5 Zusammenfassung

Malaria stellt mit einer Mortalität von über einer Million Menschen pro Jahr die bedeutsamste Tropenkrankheit für den Menschen dar. Wachsende Resistenzen der Malariaerreger gegenüber den verfügbaren Medikamenten erhöhen mehr denn je den Druck, neue Therapiemöglichkeiten sowie einen Impfstoff gegen diese Krankheit zu entwickeln. Die Sexualphase des humanen Malariaerregers *Plasmodium falciparum* rückte in den letzten Jahren in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Eine Unterbrechung des sexuellen Fortpflanzungszyklus im Laufe der Transmission von Mensch zu Stechmücke würde zu einem Verbreitungsstopp des Erregers führen. Die Entwicklung von transmissionsblockierenden Strategien, zu denen transmissionsblockierende Vakzine und Medikamente zählen, stellt eine vielversprechende Möglichkeit für den Forscher im Kampf gegen Malaria dar. Sowohl die Identifizierung von molekularen Wechselwirkungen als auch die Erforschung von an Fertilisationsereignissen beteiligten Prozessen sind wichtige Schritte, um die Sexualphase des Erregers aufzuklären und neue Angriffspunkte für Medikamente oder Vakzine zu entwickeln.

Dem Genom von *P. falciparum* konnten 92 putative Proteasen zugeordnet werden, von denen nur ein geringer Bruchteil charakterisiert worden ist. Über Proteasen, die in der Sexualphase des Erregers involviert sind, ist bisher sehr wenig bekannt. Unter Anwendung von Protease-Inhibitoren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein zentraler Prozess der männlichen Gametogenese, die Exflagellation der Mikrogameten, die Beteiligung von Proteasen verschiedener Kategorien benötigt. Die Ergebnisse belegten, dass die Aktivität von zwei oder mehr Serinproteasen, von Falcipain-ähnlichen Cysteinproteasen, von nicht-Thermolysin-ähnlichen Zink-Metalloproteasen und von Aspartatproteasen für den erfolgreichen Abschluss der männlichen Gametogenese eine wichtige Voraussetzung ist. Die Lokalisation des Cysteinproteasen- und Falcipain-hemmenden Inhibitors bADA konnte erstmals im Zytosol von Trophozoiten, Schizonten, Gametozyten aller Reifestadien und Makrogameten nachgewiesen werden. Die Beteiligung zytoplasmatischer Cysteinproteasen scheint für die Exflagellation der Mikrogameten direkt oder indirekt eine Voraussetzung zu sein.

In dieser Arbeit wurden zusätzlich die weitgehend uncharakterisierten Proteasen Calpain, DPAP2, GPI8, Metacaspase 2, Plasmepsin 6 und *PfSub3* näher untersucht. RT-PCR-Analysen konnten die Transkription der sechs ausgesuchten Proteasen in gemischten asexuellen Parasiten sowie zum Großteil in Gametozyten, Gameten und Zygoten belegen. Die Transformation von asexuellen Parasiten mit entsprechenden *knockout*-Konstrukten deckte für Metacaspase 2 und *PfSub3* auf, dass sie im asexuellen Vermehrungszyklus nicht essentiell und die entsprechenden Genloci für Rekombinationsereignisse zugänglich sind.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der übrigen Transformationen deuteten darauf hin, dass Calpain essentiell im asexuellen Vermehrungszyklus und dass der Genlocus von Plasmeysin 6 für Rekombinationsereignisse unzugänglich ist. Proteinexpressionsstudien anhand von Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenz-studien für *PfSub3* konnten Hinweise darauf liefern, dass diese Serinprotease in asexuellen Parasiten, nicht-aktivierten sowie aktivierten Sexualstadien exprimiert wird. Die Ergebnisse lassen zudem möglicherweise auf eine proteolytische Prozessierung von *PfSub3* im Laufe der Gametozytenbildung und der Gametogenese schließen. Insbesondere die verschiedenartig erscheinende *PfSub3*-Expression von einer homogenen bis punktierten Verteilung im Zellzytosol unterschiedlicher Parasitenstadien lieferte Hinweise auf eine mögliche wechselnde enzymatische Aktivität dieser Protease im Laufe des parasitären Vermehrungszyklus.

Aufgrund der in dieser Arbeit generierten Ergebnisse konnten im Laufe der Gametogenese auftretende Gametenfilamente morphologisch beschrieben sowie Hinweise auf ihre mögliche Funktion erlangt werden. Durch die Anwendung von Immunfluoreszenzstudien, rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie die Analyse lebender Gameten konnte gezeigt werden, dass die bis zu 180 µm langen Filamente am Ende geschlossen sind und einen Durchmesser von ca. 200 nm aufweisen. Die tubulären Zellausläufer konnten weiterhin als verzweigte sowie nicht-verzweigte Ausläufer der parasitären Plasmamembran dargestellt werden, die mit Zytoplasma gefüllt sind. Es konnte belegt werden, dass die Aktin-assoziierten Filamente in periodischen Abständen von beulenartigen Auswölbungen unterbrochen werden und dass sie in rasterelektronenmikroskopischen Analysen ein perlschnurartiges Erscheinungsbild aufweisen. Weiterhin wurde dokumentiert, dass die Zellausläufer mit typischen sexualstadienspezifischen Proteinen wie *Pfs25*, *Pfs230*, *Pfs48/45* und *PfCCp4* assoziiert vorliegen, wobei das Fehlen einzelner dieser Proteine jedoch nicht das Ausbilden der Gametenfilamente verhinderte. Als typisches Charakteristikum der Filamente konnte ihre Eigenschaft beschrieben werden, mehrere Makrogameten und zum Teil Gametozyten in einem Zellkuster miteinander netzartig zu verbinden, wobei bis zu neun Filamente von einem Makrogameten ausgehend beobachtet werden konnten. Die Gametenfilamente zeigten ebenfalls die Fähigkeit, an umliegende nicht-infizierte Erythrozyten sowie mit asexuellen Parasiten infizierte Erythrozyten zu adhären. Die Filamente waren bereits fünf Minuten nach der Aktivierung der Gametozyten und im Laufe der Gametogenese bei 33 bis 73 % der Zellen nachweisbar. Die Gametenfilamente blieben bis zu 12 Stunden nach Aktivierung der Gametozyten mit der Zelloberfläche verbunden. Der aktive Einzug eines Zellfilaments sowie die Bildung der Gametenfilamente im Mitteldarm der Stechmücke konnte ebenfalls demonstriert werden. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lieferten unter anderem den Grundbaustein einer formulierten Funktionshypothese für diese Gametenfilamente. Es wird angenommen, dass die Filamente

Zusammenfassung

aufgrund ihrer adhäsiven Eigenschaften im Laufe der Befruchtung von *Plasmodium* im Mitteldarm der Stechmücke auftreten. Möglicherweise bedienen sich vitale Gameten dieser Strukturen, um andere Sexualstadien zu finden und sie zu verbinden.

In dieser Arbeit konnten Proteasen bzw. Proteasekategorien, die an der Exflagellation der männlichen Gameten beteiligt sind, identifiziert und erste Daten über in Sexualstadien exprimierte spezifische Proteasen erfasst werden. Zusätzlich dazu komplettierte die Beschreibung und Charakterisierung von im Laufe der Gametogenese auftretenden Zellfilamenten die Zielstellung der vorliegenden Arbeit, einen Beitrag zur vollständigen Aufklärung der Sexualphase des humanen Malariaerregers zu leisten. Dies stellt einen wichtigen Schritt in die Richtung der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten gegen die Tropenkrankheit Malaria dar.

Summary

Malaria remains the deadliest among the tropical diseases with a death toll rate of more than one million people annually. Increasing resistance of the causative organism *Plasmodium spec.* against available drugs heightens the need for the development of new antimalarial drugs and a vaccine. Over the past decade, the sexual reproduction phase of the human malaria pathogen has garnered increasing attention because of the potential to prevent the transmission of the parasite from human to mosquito by blocking fertilization and following essential processes in the vertebrate host. Therefore, the identification of molecular interactions during fertilization processes is essential to elucidate the sexual replication phase in order to develop new transmission blocking strategies. These comprise both the development of transmission blocking drugs as well as the development of transmission blocking vaccines.

The genome of *P. falciparum* encodes for 92 putative proteases among them only few are partly characterized. Moreover, only little is known about proteases involved in the sexual reproduction phase, although they are considered as excellent drug targets. The data herein defines the involvement of proteases belonging to various protease classes in the exflagellation of male gametes in *P. falciparum*. It was shown that this essential process of male gametogenesis can be blocked by use of different protease inhibitors. The data suggests an involvement of two or more serine proteases, falcipain-like cysteine proteases, non-thermolysin-like zinc metalloproteases and aspartic proteases in microgametocyte exflagellation. Furthermore, the described data defined the localization of the cysteine protease and falcipain-blocking inhibitor bADA. This inhibitor was shown to be localized in the cytosol of trophozoites, schizonts, gametocytes at all stages of maturity and macrogametes. The collected data suggests the involvement of cytoplasmic cysteine proteases acting directly or indirectly in the microgametocyte exflagellation.

Additionally, the present thesis achieved first evidence about six specifically selected and largely uncharacterized proteases calpain, DPAP2, GPI8, metacaspase 2, plasmepsin 6 and PfSub3. RT-PCR-Analyses were conducted to demonstrate the existence of transcript and consequently genetically active gene loci for mixed asexual parasites and for most of the gametocyte, gamete and zygote stages. The transformation of asexual parasites with metacaspase-2- and PfSub3-*knockout*-constructs led to the conclusion that these proteases are non-essential during the asexual replication cycle and their gene loci are accessible to homologous recombination. Additional transformation experiments indicated both that calpain is indispensable in the asexual replication cycle and that the gene locus for *Plasmepsin 6* might be inaccessible for homologous recombination. The protein expression analysis for PfSub3 was carried out by using western blot and immunofluorescence assays.

Summary

The analysis suggests that this serine protease is expressed in asexual parasites as well as in non-activated and activated gametocytes. Moreover, the data permits the assumption that *PfSub3* undergoes proteolytic processing in the course of gametocyte maturation and gametogenesis. The application of immunofluorescence analyses revealed the changing expression pattern of *PfSub3*, varying from a homogeneously intracellular distribution to a distinct punctuated localization. This points to a varying enzymatic activity of *PfSub3* during the replication cycle of the parasite.

Based on the data described herein, both the morphologic description of newly discovered filaments of gametes emerging during gametogenesis and the assignment of their putative function was possible. Using immunofluorescence analysis, scanning electron microscopy and live imaging analysis of gametes it was shown that these tubular filaments are about 200 nm in diameter and exhibit a length of up to 180 μ m. Furthermore, it was demonstrated that they are close-ended, actin-associated and cytoplasm-containing cell extensions of the parasite's plasma membrane with a branched or straight appearance. The surface of filaments was associated with bulge-like structures and appeared in scanning electron microscopy partly as a beaded structure. Additionally, it was demonstrated that the sexual stage surface proteins *Pfs25*, *Pfs230*, *Pfs48/45* and *PfCCp4* are connected with these cell extensions, whereby the lack of single proteins did not result in a complete blockade of filament formation. The most typical feature of the filaments was described: to connect several macrogametes and even gametocytes within a cell cluster. It was defined that up to nine filaments emerged from the surface of macrogametes, which were able to adhere to non-infected erythrocytes as well as to parasite-infected erythrocytes. Analysis of their formation revealed that the filaments are formed within five minutes after gametocyte activation and are able to persist on the surface of gametes for a time period of up to 12 hours. During gametogenesis, 33 to more than 70 % of macrogametes exhibited the described filaments. It was possible to demonstrate the active retraction of a filament formed by a macrogamete as well as the generation of a filament in the mosquito midgut. Due to these findings a putative function was assigned. Thus, it can be suggested that the filaments likely form during gametogenesis in the mosquito midgut due to their adhesive properties in order to locate and collect other sexual stages. It might be possible that the filaments are used as a tool of vital gametes to enhance fertilization in the vertebrate host.

All in all, this thesis presents data to identify protease classes involved in male gametogenesis, extends the knowledge about selected proteases expressed in the parasite sexual replication phase and describes and characterizes newly discovered filaments of gametes during gametogenesis. Taken together, the demonstrated findings contribute strongly to a complete understanding of the sexual replication phase of the human malaria pathogen, which was a focus and aim of this thesis. The complete understanding of the

Summary

fertilization event and following processes is an important step towards the development of new antimalarial therapies.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten an der Gametogenese von *P. falciparum* beteiligte Proteasekategorien identifiziert und erste Erkenntnisse über die ausgewählten Proteasen Calpain, DPAP2, GPI8, Metacaspase 2, Plasmepsin 6 und PfSub3 gewonnen werden. Weiterhin bildeten die in dieser Arbeit generierten Daten über die im Laufe der Befruchtung auftretenden interzellulären Gametenfilamente die Basis für deren morphologische Beschreibung und die Formulierung einer Funktionshypothese. Beide Themenschwerpunkte erzielten Ergebnisse, die die vollständige Aufklärung der Sexualphase von *P. falciparum* näherrücken lassen. Auf der Grundlage der in dieser Arbeit beschriebenen Daten eröffnen sich neue Experimentansätze, die in zukünftigen Projekten verwendet werden könnten. Die vielversprechendsten darunter werden im Folgenden erläutert.

Die detaillierte Betrachtung von subzellulären morphologischen Veränderungen von Sexualstadien unter Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Protease-Inhibitoren TLCK, TPCK, PMSF, 1,10-Phenanthrolin, EPNP, RV112D und bADA ist bereits Gegenstand der aktuellen Forschung im Labor von Frau PD Dr. G. Pradel. Die von Frau PD Dr. G. Pradel und Frau L. Sologub durchgeführten transelektronenmikroskopischen Studien werden weiter vervollständigt, um unter anderem den Einfluss einiger der genannten Inhibitoren auf die Degradation des Pellikularkomplexes bei Makrogameten im Laufe der Gametogenese bestimmen zu können. Zusätzlich sollen Proteasen identifiziert werden, die an der Ruptur der parasitophoren Vakuolenmembran und der Erythrozytenmembran während des Parasitenausbruchs beteiligt sind. Zusätzlich könnte dies zur Erklärung der Wirkung der Protease-Inhibitoren auf die Exflagellation der Mikrogameten dienen. Die Identifizierung von subzellulären Angriffspunkten der Inhibitoren könnte die Identifizierung der dadurch inhibierten Proteasen (und nicht nur Proteasekategorien) ermöglichen. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Lokalisation des Biotin-gekoppelten Cysteinprotease-Inhibitors bADA im parasitären Zellzytosol bietet sich die Anwendung des *Pulldown*-Assays an. Dies würde der Identifikation von putativ inhibierten Proteasen im Zytosol dienen.

Die Generierung von *PfSub3-knockout*-Parasiten könnte unter Verwendung eines KO-Vektors erfolgen, der den Genlocus stabil über ein Doppel-*crossing-over* ausschaltet. Dies stellt eine Möglichkeit dar, die Funktion von *PfSub3* aufzuklären. Die Fusion des *PfSub3*-Genlocus mit einem fluoreszierenden Reportergen könnte zusammen mit der anschließenden Durchführung von *live-imaging*-Experimenten ebenfalls zur Aufklärung der Funktion dieser Protease beitragen. Mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Antiseren könnten Proteinexpressionsstudien durchgeführt werden, um die postulierte mögliche proteolytische Prozessierung von *PfSub3* zu untersuchen. Dabei könnten Gametozyten vor der Aktivierung mit einem Protease-Inhibitorgemisch inkubiert werden, um

Ausblick

proteolytische Vorgänge im Laufe der Gametogenese zu unterbinden. Anschließende Western-Blot-Analysen sowie Immunfluoreszenzstudien könnten durch den Vergleich von *PfSub3* in inhibitorbehandelten und nicht-behandelten aktivierten Gametozyten eine mögliche Hydrolyse dieser Protease im Laufe der Gametogenese nachweisen. Von besonderem Interesse wäre weiterhin die Untersuchung der in dieser Arbeit postulierten wechselnden Aktivität der Protease im Laufe des parasitären Vermehrungszyklus. In diesem Zusammenhang könnten verschiedene Parasitenstadien mit den Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren TLCK, TPCK und PMSF inkubiert und die *PfSub3*-Expression sowie -Lokalisation anschließend analysiert werden. Dies würde Hinweise über die *PfSub3*-Aktivierung und den intrazellulären Transport dieser Protease liefern. Darüber hinaus könnte die Anwendung von Immunpräzipitationsstudien oder des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems mögliche zelluläre Interaktionspartner von *PfSub3* identifizieren.

Die Verifizierung der Funktionshypothese der Gametenfilamente sollte im Vordergrund zukünftiger Forschung auf diesem Themengebiet stehen. Die in dieser Arbeit dargestellte morphologische Beschreibung der Gametenfilamente könnte durch eine rasterkraftmikroskopische Untersuchung der Filamente ergänzt werden. Zusätzlich könnten *live-imaging*-Analysen die Ausbildung der Gametenfilamente unter Einsatz von fluoreszenzgekoppelten Membranmarkern wie z.B. Ceramiden untersuchen, um den Mechanismus ihrer Entstehung zu verstehen. Von besonderem Interesse wäre dabei die Untersuchung der Zeitspanne fünf Minuten vor und nach der Gametozytenaktivierung. Die zukünftige Forschung auf diesem Themengebiet könnte ebenso Analysen umfassen, die die Befruchtung des Nagetiermalariaerregers *P. berghei* in Hinblick auf die Ausbildung ähnlicher Zellfilamente untersuchen. Die Identifizierung von morphologischen Gemeinsamkeiten bzw. Unterschieden basierend auf den Techniken, die zur morphologischen Beschreibung der Gametenfilamente bei *P. falciparum* dienen, könnte dabei einen zentralen Aspekt der Charakterisierung der möglichen *P.-berghei*-Filamente darstellen.

Zusammengenommen stellen die in dieser Arbeit generierten Daten eine breite Basis für zukünftige Experimente dar. Die hier erzielten Erkenntnisse und Hinweise können aufgegriffen werden, um an der Sexualentwicklung dieses Malariaerregers beteiligte Proteasen zu charakterisieren und dadurch einige der Proteasen als mögliche Angriffspunkte für transmissionsblockierende Strategien zu identifizieren. Die Aufklärung der Bedeutung der bei der Befruchtung des Malariaerregers auftretenden Gametenfilamente kann unter anderem ausgehend von den hier dargestellten Ergebnissen erfolgen. Dies würde einen gewichtigen Beitrag zur vollständigen Aufklärung der Sexualentwicklung bei *Plasmodium* leisten.

7 Anhang

Ergänzende Angaben

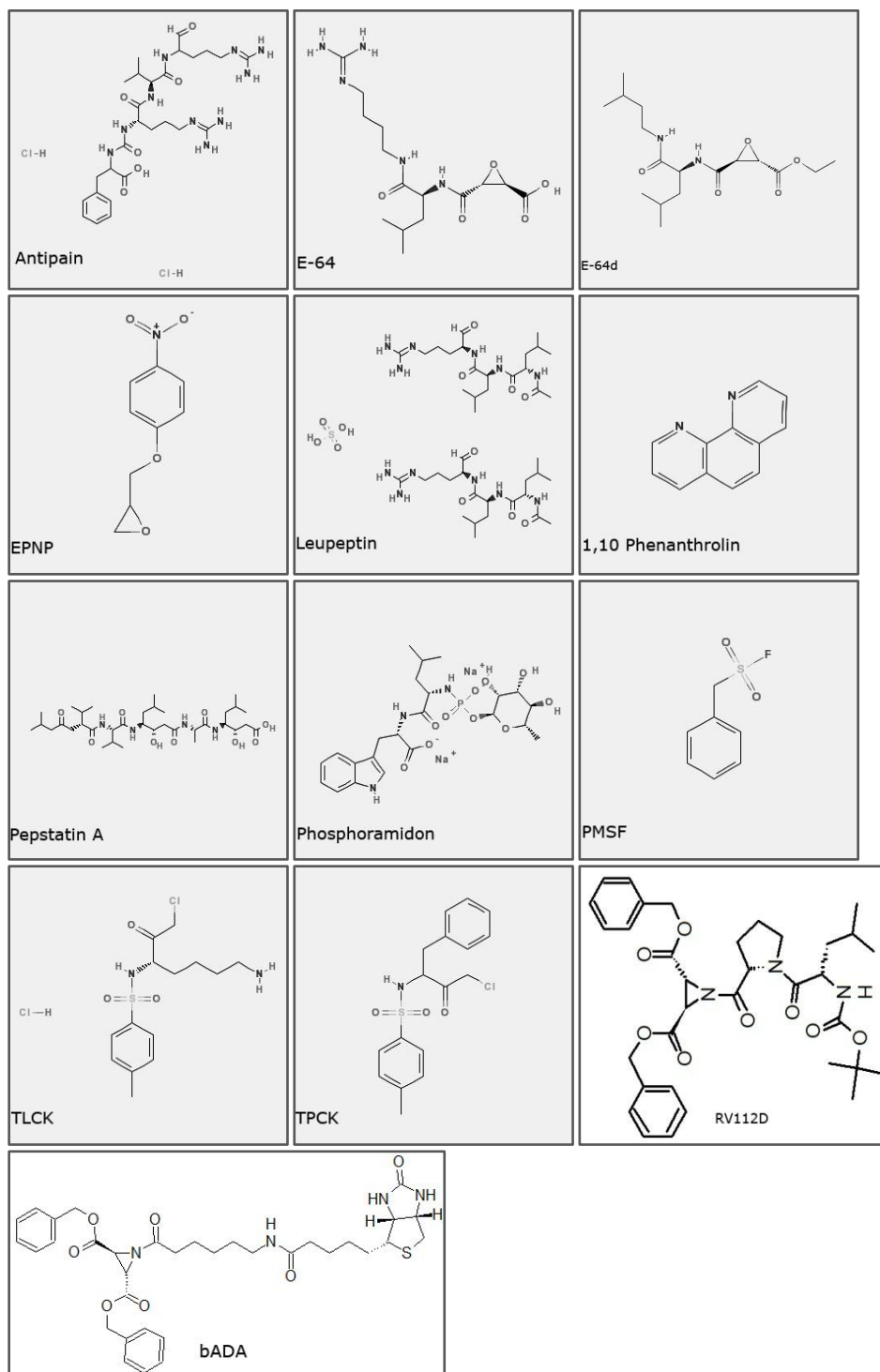


Abbildung 7.1. Strukturformeln der verwendeten Protease-Inhibitoren.

Tabelle 7.1 A. Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays mit Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren.
Konz., Konzentration; MW, Mittelwert; Stabw, Standardabweichung.

Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren						
Inhibitor	Konz. [μM]	Zählung 1 [%]	Zählung 2 [%]	Zählung 3 [%]	MW [%]	Stabw
TLCK	0	102,27	81,82	115,91	100	17,158
	25	34,09	81,82	27,27	47,73	29,722
	50	13,64	6,82	20,45	13,64	6,815
	75	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0
	500	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0
TPCK	0	94,74	94,74	110,53	100	9,116
	25	54,66	53,44	51,01	53,04	1,856
	50	9,71	12,15	7,29	9,72	2,43
	75	4,36	2,91	4,36	3,88	0,837
	100	0	0	0	0	0
	500	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0
PMSF	0	92,8	105,76	101,44	100	6,599
	25	64,75	53,96	58,27	58,99	5,431
	50	79,73	69,76	71,76	73,75	5,274
	75	62,79	55,81	69,77	62,79	6,98
	100	65,78	62,79	59,8	62,79	2,99
	500	6,47	0	0	2,16	3,735
	1000	0	0	0	0	0
Antipain	0	105,71	94,29	100	100	5,107
	25	98,57	97,14	105,71	100,47	4,591
	50	87,14	98,57	95,71	93,81	5,948
	75	95,12	62,2	65,85	74,39	18,045
	100	73,17	65,85	84,15	74,39	9,211
	500	93,2	95,53	105,44	98,06	6,499
	1000	100,19	107,77	104,85	104,27	3,823
Leupeptin	0	105,71	94,29	100	100	5,71
	25	90	108,57	111,43	103,33	11,635
	50	84,29	78,57	70	77,62	7,192
	75	72,86	82,86	75,71	77,14	5,152
	100	97,14	81,43	85,71	88,09	8,122
	500	98,57	91,43	90	93,33	4,591
	1000	72,86	68,57	92,86	78,1	12,964

Tabelle 7.1B. Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays mit Cysteinprotease- und Metalloprotease-Inhibitoren. Konz., Konzentration; MW, Mittelwert; Stabw; Standardabweichung.

Cysteinprotease-Inhibitoren						
Inhibitor	Konz. [μM]	Zählung 1 [%]	Zählung 2 [%]	Zählung 3 [%]	MW [%]	Stabw
E-64	0	97,89	113,68	88,42	100	12,761
	25	72,63	63,16	78,95	71,58	7,947
	50	87,97	85,71	47,37	73,68	22,816
	75	56,84	78,95	63,16	66,32	11,388
	100	85,26	97,89	113,68	98,94	14,239
	500	45,11	54,14	96,99	65,41	27,716
	1000	67,67	94,74	76,69	79,7	13,784
E-64d	0	110	90	100	100	10
	25	92,62	84,47	96,12	91,07	5,978
	50	107,18	108,35	97,28	104,27	6,082
	75	91,46	96,7	101,36	96,51	4,953
	100	103,33	80	156,67	113,33	39,302
	500	86,8	90,29	102,52	93,2	8,255
	1000	63,33	83,33	110	85,55	23,414
bADA	0	106,33	102,53	91,14	100	7,905
	25	123,42	74,05	113,92	103,8	26,196
	50	100,63	93,04	55,06	82,91	24,416
	75	56,96	24,68	18,99	33,543	20,478
	100	51,27	58,86	17,09	42,41	22,251
	500	5,7	3,8	1,9	3,8	1,9
	1000	3,8	0	1,9	1,9	1,9
RV112D	0	112,93	114,07	73	100	23,39
	25	109,5	158,56	82,13	116,73	38,725
	50	85,56	128,9	119,78	111,41	22,85
	75	69,59	65,02	98,1	77,57	17,926
	100	79,85	83,27	77,57	80,23	2,869
	500	13,69	27,38	44,49	28,52	15,432
	1000	22,81	7,98	14,83	15,207	7,422
Metalloprotease-Inhibitoren						
Inhibitor	Konz. [μM]	Zählung 1 [%]	Zählung 2 [%]	Zählung 3 [%]	MW [%]	Stabw
1,10 Phenanthrolin	0	128,57	82,14	89,29	100	24,999
	25	23,28	43,31	32,32	32,97	10,031
	50	46,55	36,21	60,78	47,85	12,336
	75	32,98	63,36	18,75	38,36	22,787
	100	49,78	35,56	47,84	44,39	7,711
	500	21,41	14,29	57,14	30,95	22,962
	1000	0	7,14	0	2,38	4,122
Phosphoramidon	0	121,21	93,94	84,85	100	18,922
	25	84,84	96,97	104,55	95,45	9,942
	50	74,24	69,7	96,97	80,3	14,611
	75	132,91	102,53	131,01	122,15	17,018
	100	115,82	87,34	81,65	94,94	18,308
	500	91,14	94,94	70,25	85,44	13,294
	1000	93	100,63	89,24	94,29	5,804

Tabelle 7.1.C. Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays mit Aspartatprotease-Inhibitoren. Konz., Konzentration; MW, Mittelwert; Stabw; Standardabweichung.

Aspartatprotease-Inhibitoren						
Inhibitor	Konz. [μM]	Zählung 1 [%]	Zählung 2 [%]	Zählung 3 [%]	MW [%]	Stabw
EPNP	0	100	102,17	97,83	100	2,17
	25	87,31	80,6	89,55	85,82	4,657
	50	78,36	80,6	89,55	82,84	5,921
	75	80,6	76,12	71,64	76,12	4,48
	100	60,87	58,7	52,17	57,25	4,528
	500	23,91	23,91	21,74	23,19	1,253
	1000	6,52	6,52	0	4,35	3,764
Pepstatin A	0	103,54	108,85	87,61	100	11,054
	25	104,76	130,95	100	111,9	16,666
	50	122,12	132,74	119,47	124,78	7,023
	75	153,98	132,74	119,47	135,4	17,408
	100	73,81	111,9	130,92	105,19	29,081
	500	116,81	103,54	98,23	106,19	9,57
	1000	90,27	119,47	140,7	116,81	25,32

Tabelle 7.2. Ergebnisse der Auszählung des prozentualen Anteils der filamentbildenden Makrogameten in Relation zu Makrogameten gesamt. MW, Mittelwert; Stabw; Standardabweichung.

Prozentualer Anteil der filamentbildenden Makrogameten					
Zeitpunkt nach Aktivierung [min]	Zählung 1 [%]	Zählung 2 [%]	Zählung 3 [%]	MW [%]	Stabw
5	32,43	42,85	25,0	33,43	8,967
15	70,96	58,11	73,61	67,56	8,291
30	69,16	78,46	80,49	76,04	6,041
45	66,67	76,62	76,54	73,28	5,722
60	74,43	59,13	78,04	70,53	10,039

Anhang

Tabelle 7.3. Ergebnisse der Auszählung der Filamentlänge von *Pfs230*-positiven Gameten in Immunfluoreszenzstudien. Numeriert sind die einzeln ausgewerteten Filamente.

Nr.	Länge [µm]	Nr.	Länge [µm]	Nr.	Länge [µm]	Nr.	Länge [µm]	Nr.	Länge [µm]	Nr.	Länge [µm]
1	24	31	12	61	12	91	72	121	48	151	102
2	60	32	42	62	54	92	60	122	66	152	24
3	24	33	36	63	102	93	24	123	48	153	54
4	60	34	66	64	24	94	60	124	36	154	48
5	24	35	66	65	18	95	12	125	12	155	96
6	60	36	24	66	18	96	36	126	72	156	96
7	36	37	42	67	60	97	102	127	60	157	78
8	102	38	42	68	18	98	166	128	72	158	30
9	24	39	30	69	24	99	36	129	48	159	60
10	24	40	24	70	42	100	54	130	42	160	36
11	24	41	30	71	36	101	90	131	72	161	42
12	24	42	96	72	54	102	96	132	180	162	60
13	24	43	36	73	24	103	78	133	30	163	24
14	102	44	54	74	30	104	60	134	54	164	48
15	24	45	12	75	66	105	84	135	36	165	42
16	78	46	18	76	60	106	30	136	78	166	42
17	6	47	48	77	24	107	60	137	24	167	42
18	54	48	90	78	24	108	24	138	60	168	18
19	3	49	72	79	18	109	72	139	60	169	54
20	12	50	108	80	96	110	114	140	66	170	36
21	18	51	24	81	42	111	36	141	36	171	24
22	24	52	30	82	30	112	18	142	78	172	54
23	30	53	36	83	36	113	96	143	66	173	48
24	30	54	18	84	36	114	78	144	48		
25	18	55	24	85	18	115	72	145	60		
26	48	56	12	86	12	116	42	146	108		
27	54	57	3	87	12	117	66	147	18		
28	30	58	60	88	30	118	36	148	84		
29	24	59	96	89	24	119	84	149	24		
30	18	60	48	90	66	120	30	150	54		

Tabelle 7.4. Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays mit dem Aktin-Inhibitor Cytochalasin B und dem Tubulin-Inhibitor-Colchicin. MW, Mittelwert; Stabw; Standardabweichung.

Cytochalasin B					
Konzentration [µM]	Zählung 1 [%]	Zählung 2 [%]	Zählung 3 [%]	MW [%]	Stabw
0	103,39	88,14	108,47	100	10,585
10	74,3	75,0	79,17	76,16	2,631
25	40,68	84,74	83,05	69,49	24,966
30	33,8	76,27	45,76	51,94	21,9
40	13,55	10,16	28,81	17,51	9,935
50	0	1,11	0	0,37	0,641
Colchicin					
Konzentration [µM]	Zählung 1 [%]	Zählung 2 [%]	Zählung 3 [%]	MW [%]	Stabw
0	84,21	142,1	73,68	100	36,841
10	84,21	118,42	84,21	95,61	19,751
25	86,84	31,57	63,15	60,52	27,729
30	47,36	10,5	39,47	32,44	19,409
40	7,89	5,26	13,15	8,77	4,017
50	0	0	0	0	0

Anhang

Tabelle 7.5 Ergebnisse der Auszählung des prozentualen Anteils filamentpositiver Makrogameten in mit Aktin- und Tubulin-Inhibitor-behandelten aktivierten Gametozytenkulturen. MW, Mittelwert; Stabw; Standardabweichung.

	Zählung 1 [%]	Zählung 2 [%]	Zählung 3 [%]	MW [%]	Stabw	Signi- fikanz P < 0,05
Kontrolle	93,18	91,67	84,21	89,69	4,802	-
Cyto- chalsin B	70,83	56,36	53,22	60,14	9,395	0,0083
Colchicin	74,72	64,21	60,56	66,5	7,352	0,0102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Weltweite Malariarisikogebiete.	1
¹ Quelle: WHO, 2008; verändert. (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG).	
Abbildung 1.2. Charakteristische Morphologie von <i>in-vitro</i> -kultivierten Parasitenstadien.	4
Abbildung 1.3. Der Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	6
² Quelle: Bannister & Mitchell, 2003; verändert.	
Abbildung 1.4. Darstellung der subzellulären Ultrastruktur von <i>P.-falciparum</i> -Sexualstadien anhand von transmissionselektronen-mikroskopischer Aufnahmen.	7
³ Quelle: Pradel, 2007; verändert.	
Abbildung 1.5. Die Mitglieder der PfCCp-Proteinfamilie bilden im Laufe der Gametozytogenese in der parasitophoren Vakuole Multiproteinkomplexe.	9
⁴ Quelle: Simon <i>et al.</i> , 2009; verändert.	
Abbildung 1.6. Schematische Darstellung eines Merozoitenquerschnittes (A) und des Hämoglobinabbaus in der Nahrungsvakuole von <i>P. falciparum</i> (B).	15
⁵ Quelle (A): Who/TDT Malaria Database, verändert. (http://www.eid.ac.cn/MirrorResources/2835/who.html).	
Abbildung 1.7. Schematische Darstellung der für die Studie ausgewählten Proteasen Calpain, DPAP2, GPI:Protein Transamidase, Metacaspase 2, Plasmepsin 6 und PfSub3. ...	21
Abbildung 1.8. Neuartige Zell-Zellverbindungen in Säugerzellen.	24
⁶ Quelle: Önfelt <i>et al.</i> , 2004; Rustom <i>et al.</i> , 2004; verändert.	
Abbildung 2.1A. Das verwendete KO-Vektorkonstrukt pDT_Tg23.	35
Abbildung 2.1B. Das verwendete Expressionskonstrukt pIH902 (Maina <i>et al.</i> , 1988).	36
Abbildung 2.2. Verwendeter DNA-Molekulargewichtsstandard und Proteinmarker.	38
Abbildung 2.3. Prinzip der Herstellung von KO-Parasiten durch homologe <i>single-crossover</i> -Rekombination.	49
Abbildung 2.4. Ein aktivierter Mikrogametozyt bindet an umliegende Erythrozyten und bildet ein Exflagellationszentrum.	51
Abbildung 2.5. Phasendiagramm von CO ₂ und Prinzip der Kritischer-Punkt-Trocknung.	57
Abbildung 3.1A. Die Wirkung von Cystein-/Serinprotease-, und Cysteinprotease-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation.	77
Abbildung 3.1B. Die Wirkung von Metalloprotease- und Aspartatprotease-Inhibitoren auf die Mikrogametozytenexflagellation.	78
Abbildung 3.2 Immunlokalisation von bADA in damit behandelten <i>P.-falciparum</i> -Kulturen.	80
Abbildung 3.3. Transkriptionsanalysen ausgewählter Proteasen in asexuellen Parasitenkulturen und Sexualstadien.	82

Abbildung 3.4. Genloci der KO-Parasitenkulturen für Calpain, GPI8 und Plasmeysin 6 nach Pyrimethaminselektion.	84
Abbildung 3.5. Genlocus der Metacaspase 2-KO-Parasitenkulturen nach Pyrimethaminselektion.	85
Abbildung 3.6. Genlocianalysen der <i>PfSub3</i> -KO-Parasitenkulturen nach Pyrimethaminselektion.	86
Abbildung 3.7. Schematische Darstellung des <i>PfSub3</i> Proteins.....	87
Abbildung 3.8. Expression und Aufreinigung des rekombinanten MBP-Sub3 und MBP-Proteins.....	88
Abbildung 3.9. Test der Immunseren gegen <i>PfSub3</i> an rekombinatem Protein und wildtypischen Plasmodien.	90
Abbildung 3.10. Untersuchung der Fluoreszenzstärke der Immunseren gegen <i>PfSub3</i> in der indirekten Immunfluoreszenz.....	92
Abbildung 3.11. Immunlokalisation von <i>PfSub3</i> bei <i>P. falciparum</i>	94
Abbildung 3.12. Die Assoziation sexualstadienspezifischer Proteine mit Zellfilamenten in <i>P. falciparum</i>	96
Abbildung 3.13. Die Bildung von Gametenfilamenten in KO-Parasitenkulturen sexualstadienspezifischer Proteine.....	98
Abbildung 3.14. Analyse des Zeitpunktes der Filamentbildung und der Filamentlänge.	99
Abbildung 3.15. Zellklusterbildung aktivierter Makrogameten und die Rolle der parasitophoren Vakuolenmembran und Erythrozytenmembran bei der Filamententwicklung.	101
Abbildung 3.16. Die Rolle von Aktin und Tubulin bei der Exflagellationzentren- und Zellfilamentbildung.	103
Abbildung 3.17. Die Rolle von Aktin und Tubulin bei der Zellfilamentbildung.	104
Abbildung 3.18. Morphologie der Gametenfilamente im Rasterelektronenmikroskop.....	105
Abbildung 3.19. LysoTracker-Markierung lebender Parasitenstadien und Analyse der Gametenfilamente.	107
Abbildung 3.20. Lebende Makrogameten bilden filamentartige, zytoplasmagefüllte Zellausläufer in GFP-exprimierenden Parasiten.	108
Abbildung 3.21. Makrogameten bilden <i>in vivo</i> Filamente.	109
Abbildung 4.1. Mögliche Rekombinationsereignisse des <i>PfSub3</i> -Genlocus als Folge einer Transfektion mit dem <i>PfSub3-knockout</i> -Konstrukt.	133
Abbildung 4.2. Schematische Darstellung des <i>PfSub3</i> -Polypeptids und dessen Größe nach möglichen Prozessierungen.	136
Abbildung 4.3. Vergleich der Aminosäuresequenzen der Proteasen <i>PfSub1</i> (PFE0370c) und <i>PfSub3</i> (PFE0355c).....	139

Abbildung 7.1. Strukturformeln der verwendeten Protease-Inhibitoren.....	166
---	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1. Für die Studie ausgewählte Proteasen.	18
Tabelle 1.2. Zusammenfassung der wichtigsten Charakteristika der bisher in der Literatur beschriebenen membranösen Zellausläufer.	25
Tabelle 2.1. Verwendete Geräte und deren Hersteller.	28
Tabelle 2.2. Verwendete Puffer und Lösungen.	31
Tabelle 2.3. Verwendete Medien.	33
Tabelle 2.4. Verwendete Oligonukleotide.	37
Tabelle 2.5A. Verwendete Protease-Inhibitoren.	39
Tabelle 2.5B. Verwendete Aktin- und Tubulin-Inhibitoren.	40
Tabelle 2.6. Verwendete Immunsereen und Antikörper in indirekten Immunfluoreszenzstudien und Western-Blot-Analysen.	40
Tabelle 2.7. Für die Arbeit relevante Gene bzw. Proteine und ihre Genidentifizierungsnummern gemäß der <i>P. falciparum</i> -Datenbank www.plasmodb.org	42
Tabelle 2.8. Verwendete Komponenten und Bedingungen in PCR-Reaktionen.	59
Tabelle 2.9. Zusammensetzung von DNA-Verdau-Reaktionen.	61
Tabelle 2.10. Verwendete Komponenten und Bedingungen in PCR-Reaktionen für Sequenzierungen.	64
Tabelle 3.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays unter Verwendung von Protease-Inhibitoren.	76
Tabelle 3.2. Erwartete Bandengrößen der PCR-Produkte bei Genlocus-Analysen der KO-Parasiten.	83
Tabelle 3.3. Assoziation von sexualstadienspezifischen Proteinen und Zytoskelettproteinen mit Gametenfilamenten und deren Bildung in entsprechenden KO-Linien.	97
Tabelle 4.1. Zusammenfassung der wichtigsten Zellfilamentcharakteristika der in dieser Arbeit beschriebenen membranösen Zellausläufer.	156
Tabelle 7.1 A. Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays mit Cystein-/Serinprotease-Inhibitoren.	167
Tabelle 7.1B. Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays mit Cysteinprotease- und Metalloprotease-Inhibitoren.	168
Tabelle 7.1.C. Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays mit Aspartatprotease-Inhibitoren.	169
Tabelle 7.2. Ergebnisse der Auszählung des prozentualen Anteils der filamentbildenden Makrogameten in Relation zu Makrogameten gesamt.	169
Tabelle 7.3. Ergebnisse der Auszählung der Filamentlänge von <i>Pfs230</i> -positiven Gameten in Immunfluoreszenzstudien.	170

Tabelle 7.4. Ergebnisse der Exflagellationsinhibitionsassays mit dem Aktin-Inhibitor Cytochalasin B und dem Tubulin-Inhibitor-Colchicin.....	170
Tabelle 7.5 Ergebnisse der Auszählung des prozentualen Anteils filamentpositiver Makrogameten in mit Aktin- und Tubulin-Inhibitor-behandelten aktivierten Gametozytenkulturen. .	171

Abkürzungen und Einheiten

∅	Durchmesser
°C	Grad Celsius
3' RL	3' Ende rekombinierter Genlocus
5' RL	5' Ende rekombinierter Genlocus
α	anti
A.	<i>Anopheles</i>
AG	Arbeitsgruppe
AMA	<i>apical membrane antigen</i>
Amp	Ampicillin
APAD	<i>acetyl pyridine adenine dinucleotide</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bADA	<i>biotinylated dibenzyl aziridine-2,3-dicarboxylic acid</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
c	centi (10 ⁻²)
ca.	circa
CAM	Calmodulin
CCp	<i>Limulus coagulation factor C domain-containing proteins</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDPK4	<i>calcium dependent protein kinase 4</i>
CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan DMSO
DHFR-TS	Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DPAP	<i>dipeptidyl aminopeptidase</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Anhang

E-64	<i>N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidino-butylamide</i>
E-64d	<i>(2S,3S)-trans-Epoxy-succinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester</i>
ecp	<i>egress cysteine protease</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Exflagellationsinhibitionsassays
EMP	<i>erythrocyte membrane protein</i>
EPNP	<i>1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propane</i>
ER	endoplasmatischen Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
F	Farad
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m / sec ²)
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GPI8	GPI:Protein-Transamidase
GZ	Gametozyt
HAP	<i>histoaspartic protease</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
hrp	histonreiches Protein
ICM	RPMI-Medium <i>incomplete</i>
IFA	indirekte Immunfluoreszenzanalyse
IPTG	Isopropyl-β-D-Thigalactopyranosid
k	Kilo (10 ³)
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
KP	Kritischer Punkt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LSA	<i>liver stage antigen</i>
LSM	<i>Laser-Scanning-Mikroskop</i>
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Meter
m	Milli (10 ⁻³)

Anhang

M	molar
MaG	Makrogamet
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	Maltose-Binde-Protein
MCA	Metacaspase
MiG	Mikrogamet
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSP	<i>merozoite surface protein</i>
MW	Mittelwert
n	nano (10^{-9})
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
neg.	negativ
nek	<i>Nima-related protein kinase</i>
NPP	<i>Nutrient Permeation Pathway</i>
OD	optische Dichte
p	pico (10^{-12})
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PAA	Polyacrylamid
<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
peg	<i>proteins of early gametocytes</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PKG	<i>cGMP-dependent protein kinase</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
pos.	positiv
psi	<i>pounds per square inch</i>
Pv	<i>Plasmodium vivax</i>
PVM	parasitophore Vakuolenmembran
REM-Analyse	rasterelektronenmikroskopische Analyse
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-Medium	Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat

Anhang

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERA	<u>serine repeat antigen</u>
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tools</i>
<i>spec.</i>	<i>species</i>
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
Stabw	Standardabweichung
Sub	<u>subtilisin-like protease</u>
TBM	transmissionsblockierende Medikamente
TBS	transmissionsblockierende Strategien
TBV	transmissionsblockierende Vakzine
TEM-Analyse	Transmissionselektronenmikroskopische Analyse
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>Tg</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLCK	N- α -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride
T_m	Schmelztemperatur
TNT	Tunnel-nanotubes (<u>T</u> unneling <u>n</u> ano <u>t</u> ubes)
TPCK	N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
TRAP	<u>thrombospondin-related anonymous protein</u> oder auch SSP2 für <u>s</u> porozoite <u>s</u> urface <u>p</u> rotein 2)
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
UTR	Untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
WHO	<u>World Health Organization</u>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Rupp I., Bosse R., Schirmeister T. & Pradel G. (2008). Effect of protease inhibitors on exflagellation in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 158, 208-212.

Pradel G., **Rupp I.**, Sologub L., Scheuermayer M., Reininger L., Doerig C., Eksi S., Kombila D.U., Frank M & Williamson K.C. (in Revision). Malaria parasites form filamentous cell-to-cell connections during reproduction in the mosquito midgut. *Cell Research*.

Tagungsbeiträge

Rupp I., Agarwal S., Doerig C. & Pradel G (2006). Characterization of various sexual stage-specific proteases and kinases as potential targets in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum* (Posterpräsentation). 58. Treffen der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg.

Rupp I., Bosse R., Sologub L., Schirmeister T. & Pradel G. (2006). Fertilization processes in *Plasmodium falciparum* – in search for potential candidates for antimalarials (Vortrag). 3. Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Malaria der Paul-Ehrlich-Gesellschaft, Missionsärztliche Klinik Würzburg.

Rupp I., Bosse R., Sologub L., Kühn A., Schirmeister T. & Pradel G. (2007). Novel cell-to-cell contacts between malaria sexual stages (eingeladener Vortrag). London School of Hygiene & Tropical Medicine, 19. Juli 2007, London, Großbritannien.

Rupp I., Bosse R., Sologub L., Kühn A., Schirmeister T. & Pradel G. (2007). Novel cell-to-cell contacts between malaria sexual stages (eingeladener Vortrag). Imperial College London, 20. Juli 2007, London, Großbritannien.

Rupp I., Sologub L. & Pradel G. (2007). Novel cell-to-cell contacts between *Plasmodium falciparum* sexual stages (Posterpräsentation). 18. Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, Massachusetts, USA.

Simon N., Kühn A., Scholz S.M., **Rupp I.**, Dude M.A., Moreira C., Alano P., Williamson K.C., Templeton T.J., Sauerwein R.W., Pradel G. (2008). Molecular interactions of sexual stage-specific adhesion proteins in *Plasmodium falciparum* (Posterbeitrag). 23. Treffen der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg.

Anhang

Rupp I., Kühn A., Sologub L. & Pradel G. (2008). Novel cell-to-cell contacts between *Plasmodium falciparum* sexual stages (Vortrag). 23. Treffen der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg.

Literaturverzeichnis

- Aikawa M. (1966). The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites, *Plasmodium fallax*, *P. lophurae*, and *P. cathemerium*. *Am J Trop Med Hyg* **15**, 449-471.
- Aikawa M. (1971). Plasmodium: The fine structure of malarial parasites. *Exp Parasitol* **30**, 284-320.
- Aikawa M. (1988). Fine structure of malaria parasites in the various stages of development. In *Malaria- Principles and Practice of Malariology*, ed. Wernsdorfer WH & McGregor SI, pp. 2048. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Aikawa M, Torii M, Sjölander A, Berzins K, Perlmann P & Miller LH. (1990). Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Exp Parasitol* **71**, 326-329.
- Alano P. (2007). *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol* **66**, 291-302.
- Alano P, Roca L, Smith DK, Read D, Carter R & Day K. (1995). *Plasmodium falciparum*: Parasites Defective in Early Stages of Gametocytogenesis. *Experimental Parasitology* **81**, 227-235.
- Aly AS & Matuschewski K. (2005). A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med* **202**, 225-230.
- Amino R, Thiberge S, Blazques S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S & Menard R. (2007). Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc* **2**, 1705-1712.
- Andrews KT, Gatton ML, Skinner-Adams TS, McCarthy JS & Gardiner DL. (2007). HIV-malaria interactions: don't forget the drugs. *Science* **315**, 1791.
- Ansorge I, Benting J, Bhakdi S & Lingelbach K. (1996). Protein sorting in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. *Biochem J* **315**, 307-314.
- Ansorge I, Paprotka K, Bhakdi S & Lingelbach K. (1997). Permeabilization of the erythrocyte membrane with streptolysin O allows access to the vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum* and a molecular analysis of membrane topology. *Mol Biochem Parasitol* **84**, 259-261.
- Aoyagi T, Takeuchi T, Matsuzaki A, Kawamura K, Kondo S, Hamada M, Maeda K & Umezawa H. (1969). Leupeptins, new protease inhibitors from Actinomycetes. *J Antibiot* **22**, 283-286.
- Arai M, Billker O, Morris HR, Panico M, Delcroix M, Dixon D, Ley SV & Sinden RE. (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.
- Arastu-Kapur S, Ponder EL, Fonović UP, Yeoh S, Yuan F, Fonović M, Grainger M, Phillips CI, Powers JC & Bogoy M. (2008). Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Chem Biol* **4**, 203-213.

- Aravind L, Dixit VM & Koonin EV. (1999). The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* **24**, 47-53.
- Arkwright PD, Luchetti F, Tour J, Roberts C, Ayub R, Morales AP, Rodríguez JJ, Gilmore A, Canonico B, Papa S & Esposti MD. (in Druck). Fas stimulation of T lymphocytes promotes rapid intercellular exchange of death signals via membrane nanotubes. *Cell Res*.
- Auld DS. (1995). Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases. *Methods Enzymol* **248**, 228-242.
- Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Dommer J, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Innamorato F, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer E, Li W, Miller JA, Nayak V, Pennington C, Pinney DF, Roos DS, Ross C, Stoeckert CJ, Treatman C & Wang H. (2009). PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res* **37**.
- Baker DA, Daramola O, McCrossan MV, Harmer J & Targett GA. (1994). Subcellular localization of Pfs16, a Plasmodium falciparum gametocyte antigen. *Parasitology* **108 (Pt 2)**, 129-137.
- Baker RP, Wijetilaka R & Urban S. (2006). Two Plasmodium Rhomboid Proteases Preferentially Cleave Different Adhesins Implicated in All Invasive Stages of Malaria. *PLoS Pathog* **2**, 0922-0932.
- Banaszynski LA, Chen LC, Maynard-Smith LA, Ooi AG & Wandless TJ. (2006). A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell* **126**, 995-1004.
- Banerjee R, Liu J, Beatty W, Pelosof L, Klemba M & Goldberg DE. (2002). Four plasmepsins are active in the Plasmodium falciparum food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 990-995.
- Barrett AJ & Rawlings ND. (2007). 'Species' of peptidases. *Biol Chem* **Vol. 388**, 151-1157.
- Behari R & Haldar K. (1994). Plasmodium falciparum: protein localization along a novel, lipid-rich tubovesicular membrane network in infected erythrocytes. *Exp Parasitol* **79**, 250-259.
- Bijlmakers MJ & Marsh M. (2003). The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol* **13**, 32-42.
- Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B & Brinkmann V. (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* **117**, 503-514.
- Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE & Morris HR. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**, 289-292.
- Billker O, Shaw MK, Margos G & Sinden RE. (1997). The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei in vitro. *Parasitology* **115 (Pt 1)**, 1-7.

- Bishop A & Gilchrist BM. (1946). Experiments upon the feeding of *Aedes aegypti* through animal membranes with a view to applying this method to chemotherapy of malaria. *Parasitology* **37**, 85-100.
- Blackman MJ. (2008). Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade. *Cell Microbiol* **10**, 1925-1934.
- Bojang KA. (2006). RTS,S/AS02A for malaria. *Expert Rev Vaccines* **5**, 611-615.
- Bongfen SE, Balam S, Torgler R, Romero JF & Corradin G. (2008). Processing of the circumsporozoite protein in infected hepatocytes is not dependent on aspartic proteases. *Parasite Immunol* **30**, 375-378.
- Bongfen SE, Torgler R, Romero JF, Renia L & Corradin G. (2007). Plasmodium berghei-infected primary hepatocytes process and present the circumsporozoite protein to specific CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* **178**, 7054-7063.
- Bosse R. (2008). Charakterisierung parasitärer Proteasen und Kinasen während Befruchtungsvorgängen des humanpathogenen Malariaerregers Plasmodium falciparum In *Zentrum für Infektionsforschung*, pp. 114. Universität Würzburg, Würzburg.
- Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J & DeRisi JL. (2003). The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol* **1**, E5.
- Breman JG. (2009). Eradicating malaria. *Sci Prog* **92**, 1-38.
- Breman JG, Alilio MS & Mills A. (2004). Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary *Am J Trop Med Hyg* **71**, 1-15.
- Breman JG & Plowe CV. (2009). A Malaria Vaccine for Control: More Progress. *J Infect Dis* **200**, 317-320.
- Brooks SR & Williamson KC. (2000). Proteolysis of Plasmodium falciparum surface antigen, Pfs230, during gametogenesis. *Mol Biochem Parasitol* **106**, 77-82.
- Bruce MC, Alano P, Duthie S & Carter R. (1990). Commitment of the malaria parasite Plasmodium faciparum to sexual and asexual development. *Parasitology* **100 (Bd.2)**, 191-200.
- Bruce MC, Carter RN, Nakamura K, Aikawa M & Carter R. (1994). Cellular location and temporal expression of the Plasmodium falciparum sexual stage antigen Pfs16. *Mol Biochem Parasitol* **65**, 11-22.
- Bukoreshtliev NV, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso JFV & Gerdes HH. (2009). Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett* **583**, 1481-1488.
- Bustamante PJ, Woodruff DC, Oh J, Keister DB, Muratova O & Williamson KC. (2000). Differential ability of specific regions of Plasmodium falciparum sexual-stage antigen, Pfs230, to induce malaria transmission-blocking immunity. *Parasite Immunol* **22**, 373-380.
- Carruthers VB & Blackman MJ. (2005). A new release on life: emerging concepts in proteolysis and parasite invasion. *Mol Microbiol* **55**, 1617-1630.

- Carter R & Chen DH. (1976). Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite. *Nature* **263**, 57-60.
- Carter SB. (1967). Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* **213**, 261-264.
- Carter V, Shimizu S, Arai M & Dessens JT. (2008). PbSR is synthesized in macrogametocytes and involved in formation of the malaria crystalloids. *Mol Microbiol* **68**, 1560-1569.
- Casares S & Richie TL. (2009). Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. *Curr Opin Immunol* **21**, 321-330.
- Chandramohanadas R, Davis PH, Beiting DP, Harbut MB, Darling C, Velmourougane G, Lee MY, Greer PA, Roos DS & Greenbaum DC. (2009). Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells. *Science* **324**, 794-797.
- Cintra WM & De Souza W. (1985). Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy of detergent extracted tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Submicrosc Cytol* **17**, 503-508.
- Claudianos C, Dessens JT, Trueman HE, Arai M, Mendoza J, Butcher GA, Crompton T & Sinden RE. (2002). A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development. *Mol Microbiol* **45**, 1473-1484.
- Clyde DF, Most H, McCarthy VC & Vanderberg JP. (1973). Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* **266**, 169-177.
- Coombs GH, Goldberg DE, Klemba M, Berry C, Kay J & Mottram JC. (2001). Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol* **17**, 532-537.
- Coombs GH & Mottram JC. (1997). Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology* **114**, Suppl:S61-80.
- Cooper JA. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**, 1473-1478.
- Coué M, Brenner SL, Spector I & Korn ED. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* **213**, 316-318.
- Cowman AF & Crabb BS. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**, 755-766.
- Cox-Singh J & Singh B. (2008). Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol* **24**, 406-410.
- Czesny B, Goshu S, Cook JL & Williamson KC. (2009). The proteasome inhibitor epoxomicin has potent *Plasmodium falciparum* gametocytocidal activity. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4080-4085.
- Dalal S & Klemba M. (2007). Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **282**, 35978-35987.
- Davis DM & Sowinski S. (2008). Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 431-436.

- Day KP, Hayward RE & Dyer M. (1998). The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Parasitology* **116**, Supp:S95-109.
- de Koning-Ward TF, Janse CJ & Waters AP. (2000). The development of genetic tools for dissecting the biology of malaria parasites. *Annu Rev Microbiol* **54**, 157-185.
- de Koning-Ward TF, Olivieri A, Bertuccini L, Hood A, Silvestrini F, Charvalias K, Berzosa Díaz P, Camarda G, McElwain TF, Papenfuss T, Healer J, Baldassarri L, Crabb BS, Alano P & Ranford-Cartwright LC. (2008). The role of osmiophilic bodies and Pfg377 expression in female gametocyte emergence and mosquito infectivity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **67**, 278-290.
- Debrabant A & Delplace P. (1989). Leupeptin alters the proteolytic processing of P126, the major parasitophorous vacuole antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **33**, 151-158.
- Dechering KJ, Thompson J, Dodemont HJ, Eling W & Konings RN. (1997). Developmentally regulated expression of pfs16, a marker for sexual differentiation of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **89**, 235-244.
- Delorenzi M, Sexton A, Shams-Eldin H, Ralph T, Schwarz RT, Terry Speed T & Schofield L. (2002). Genes for Glycosylphosphatidylinositol Toxin Biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* **70**, 4510-4522.
- Desai A & Mitchison TJ. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 83-117.
- Dessens JT, Sinden RE & Claudianos C. (2004). LCCL proteins of apicomplexan parasites. *Trends Parasitol* **20**, 102-108.
- Dhawan S, Dua M, Chishti AH & Hanspal M. (2003). Ankyrin peptide blocks falcipain-2-mediated malaria parasite release from red blood cells. *J Biol Chem* **278**, 30180-30186.
- Dluzewski AR, Rangachari K, Wilson RJ & Gratzer WB. (1986). *Plasmodium falciparum*: protease inhibitors and inhibition of erythrocyte invasion. *Exp Parasitol* **62**, 416-422.
- Dobbelaere J, Josue F, Suijkerbuijk S, Baum B, Tapon N & Raff J. (2008). A genome-wide RNAi screen to dissect centriole duplication and centrosome maturation in *Drosophila*. *PLoS Biol* **6**, e224.
- Dobrowolski JM, Niesman IR & Sibley LD. (1997). Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil Cytoskeleton* **37**, 253-262.
- Doerig C, Billker O, Haystead T, Sharma P, Tobin AB & Waters NC. (2008). Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol* **24**, 570-577.
- Donald RG & Roos DS. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11703-11707.
- Dorin-Semblat D, Quashie N, Halbert J, Sicard A, Doerig C, Peat E, Ranford-Cartwright L & Doerig C. (2007). Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by reverse genetics. *Mol Microbiol* **65**, 1170-

- Dowse TJ, Koussis K, Blackman MJ & Soldati-Favre D. (2008). Roles of proteases during invasion and egress by Plasmodium and Toxoplasma. *Subcell Biochem* **47**, 121-139.
- Draper SJ, Moore AC, Goodman AL, Long CA, Holder AA, Gilbert SC, Hill F & Hill AV. (2008). Effective induction of high-titer antibodies by viral vector vaccines. *Nat Med* **14**, 819-821.
- Drew ME, Banerjee R, Uffman EW, Gilbertson S, Rosenthal PJ & Goldberg DE. (2008). Plasmodium food vacuole plasmepsins are activated by falcipains. *J Biol Chem* **283**, 12870-12876.
- Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, Audran R, Bouzidi A, Oeuvray C & Roussilhon C. (2005). A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill Plasmodium falciparum. *PLoS Med* **2**, e344.
- Dude MA, Kaeppler U, Herb M, Schiller M, Schulz F, Vedder B, Heppner S, Pradel G, Gut J, Rosenthal PJ, Schirmeister T, Leippe M & Gelhaus C. (2008). Synthesis and evaluation of non-peptidic cysteine protease inhibitors of P. falciparum derived from etacrynic acid. *Molecules* **14**, 19-35.
- Duffy PE & Kaslow DC. (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 MT, Triglia T & Cowman AF. (2002). Negative selection of Plasmodium falciparum reveals targeted gene deletion by double crossover recombination. *Int J Parasitol* **32**, 81-89.
- Dutta S, Lalitha PV, Ware LA, Barbosa A, Moch JK, Vassell MA, Fileta BB, Kitov S, Kolodny N, Heppner DG, Haynes JD & Lanar DE. (2002). Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 expressed in Escherichia coli. *Infect Immun* **70**, 3101-3110.
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H & Deplazes P. (2008). *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Enke Verlag, Stuttgart.
- Eggleston KK, Duffin KL & Goldberg DE. (1999). Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **274**, 32411-32417.
- Eibl RH & Moy VT. (2005). Atomic force microscopy measurements of protein-ligand interactions on living cells. *Methods Mol Biol* **305**, 439-450.
- Eichner M, Diebner HH, Molineaux L, Collins WE, Jeffery GM & Dietz K. (2001). Genesis, sequestration and survival of Plasmodium falciparum gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malariatherapy data. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**, 497-501.
- Eksi S, Czesny B, Greenbaum DC, Bogyo M & Williamson KC. (2004). Targeted disruption of Plasmodium falciparum cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth. *Mol Microbiol* **53**, 243-250.
- Eksi S, Czesny B, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Eling W & Williamson KC. (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 GJ, Sauerwein RW, Eling W & Williamson KC. (2007). Inhibition of *Plasmodium falciparum* oocyst production by membrane-permeant cysteine protease inhibitor E64d. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1064-1070.
- Eksi S, Stump A, Fanning SL, Shenouda MI, Fujioka H & Williamson KC. (2002). Targeting and sequestration of truncated Pfs230 in an intraerythrocytic compartment during *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *Mol Microbiol* **44**, 1507-1516.
- Eksi S, Suri A & Williamson KC. (2008). Sex- and stage-specific reporter gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **160**, 148-151.
- Ettari R, Micale N, Schirmeister T, Gelhaus C, Leippe M, Nizi E, Di Francesco ME, Grasso S & Zappalà M. (2009). Novel peptidomimetics containing a vinyl ester moiety as highly potent and selective falcipain-2 inhibitors. *J Med Chem* **52**, 2157-2160.
- Eugenin EA, Gaskill PJ & Berman JW. (2009). Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell Immunol* **254**, 142-148.
- Evans WH & Martin PEM. (2002). Gap junctions: structure and function. *Mol Membr Biol* **19**, 121-136.
- Fahrney DE & Gold AM. (1963). Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, alpha-chymotrypsin, and trypsin. *J Am Chem Soc* **85**, 997-1000.
- Felber JP, Coombs TL & Vallee BL. (1962). The mechanism of inhibition of carboxypeptidase A by 1,10-phenanthroline. *Biochemistry* **1**, 231-238.
- Ferguson MAJ. (2000). Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10673-10675.
- Fidock DA, Eastman RT, Ward SA & Meshnick SR. (2008). Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. *Trends Parasitol* **24**, 537-544.
- Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R & Nwaka S. (2004). Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 509-520.
- Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, Moch JK, Muster N, Sacci JB, Tabb DL, Witney AA, Wolters D, Wu Y, J. M, Gardner, Holder AA, Sinden RE, Yates JR & Carucci DJ. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* **419**, 520-526.
- Foth BJ & McFadden GI. (2003). The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* **224**, 57-110.
- Fowler RE, Sinden RE & Pudney M. (1995). Inhibitory activity of the anti-malarial atovaquone (566C80) against ookinetes, oocysts, and sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J Parasitol* **81**, 452-458.
- Francis SE, Banerjee R & Goldberg DE. (1997a). Biosynthesis and maturation of the malaria aspartic hemoglobinases plasmepsins I and II. *J Biol Chem* **272**, 14961-14968.
- Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Knickerbocker A, Mueller R, Bryant ML, Sherman DR, Russell DG & Goldberg DE. (1994). Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase. *EMBO J* **13**, 306-317.

- Francis SE, Sullivan DJJ & Goldberg DE. (1997b). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* **51**, 97-123.
- Fries HC, Lamers MB, van Deursen J, Ponnudurai T & Meuwissen JH. (1990). Biosynthesis of the 25-kDa protein in the macrogametes/zygotes of *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol* **71**, 229-235.
- Furuya T, Mu J, Hayton K, Liu A, Duan J, Nkrumah L, Joy DA, Fidock DA, Fujioka H, Vaidya AB, Wellems TE & XZ. S. (2005). Disruption of a *Plasmodium falciparum* gene linked to male sexual development causes early arrest in gametocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16813-16818.
- Galkina SI, Molotkovsky JG, Ullrich V & Sud'ina GF. (2005). Scanning electron microscopy study of neutrophil membrane tubulovesicular extensions (cytonemes) and their role in anchoring, aggregation and phagocytosis. The effect of nitric oxide. *Exp Cell Res* **304**, 620-629.
- Galkina SI, Sud'ina GF & Ullrich V. (2001). Inhibition of neutrophil spreading during adhesion to fibronectin reveals formation of long tubulovesicular cell extensions (cytonemes). *Exp Cell Res* **266**, 222-228.
- Gantt S, Persson C, Rose K, Birkett AJ, Abagyan R & Nussenzweig V. (2000). Antibodies against thrombospondin-related anonymous protein do not inhibit *Plasmodium* sporozoite infectivity in vivo. *Infect Immun* **68**, 3667-3673.
- Garcia GE, Wirtz RA, Barr JR, Woolfitt A & Rosenberg R. (1998). Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. *J Biol Chem* **273**, 12003-12005.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM & Barrell B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498-511.
- Gelhaus C, Vicik R, Hilgenfeld R, Schmidt CL, Leippe M & Schirmeister T. (2004). Synthesis and antiplasmodial activity of a cysteine protease-inhibiting biotinylated aziridine-2,3-dicarboxylate. *Biol Chem* **385**, 435-438.
- Gelhaus C, Vicik R, Schirmeister T & Leippe M. (2005). Blocking effect of a biotinylated protease inhibitor on the egress of *Plasmodium falciparum* merozoites from infected red blood cells. *Biol Chem* **386**, 499-502.
- Gerdes HH, Bukoreshtliev NV & Barroso JF. (2007). Tunneling nanotubes: A new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* **581**, 2194-2201.
- Gerdes HH & Carvalho RN. (2008). Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 470-475.
- Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA & Schwarz RT. (1996). Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **75**, 131-143.

- Gilson PR, Neb T, Vukcevic D, Robert L, Moritz RL, Sargeant T, Speed TP, Schofield L & Crabb BS. (2006). Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1286-1299.
- Glading A, Lauffenburger D & Wells A. (2002). Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol* **12**, 46-54.
- Glushakova S, Yin D, Li T & Zimmerberg J. (2005). Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr Biol* **15**, 1645-1650.
- Goh SL, Goh LL & Sim TS. (2005). Cysteine protease falcipain 1 in *Plasmodium falciparum* is biochemically distinct from its isozymes. *Parasitol Res* **97**, 295-301.
- Goodyer ID & Taraschi TF. (1997). *Plasmodium falciparum*: a simple, rapid method for detecting parasite clones in microtiter plates. *Exp Parasitol* **86**, 158-160.
- Gorby YA, Yanina S, McLean JS, Rosso KM, Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge TJ, Chang IS, Kim BH, Kim KS, Culley DE, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Hill EA, Shi L, Elias DA, Kennedy DW, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii S, Logan B, Nealon KH & Fredrickson JK. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11358-11363.
- Gould SB, Waller RF & McFadden GI. (2008). Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 491-517.
- Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A, Browman DT, Chenouard N, de Chaumont F, Martino A, Enninga J, Olivo-Marin J-C, Männel D & Zurzolo C. (2009). Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* **11**, 328-336.
- Greenbaum DC, Baruch A, Grainger M, Bozdech Z, Medzihradzky KF, Engel J, DeRisi J, Holder AA & Bogyo M. (2002). A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite. *Science* **298**, 2002-2006.
- Grenier G, Van Sande J, Willems C, Neve P & Dumont JE. (1975). Effects of microtubule inhibitors and cytochalasin B on thyroid metabolism in vitro. *Biochimie* **57**, 337-341.
- Günther K, Tümmler M, Arnold HH, Ridley R, Goman M, Scaife JG & Lingelbach K. (1991). An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. *Mol Biochem Parasitol* **46**, 149-157.
- Gurke S, Barroso JF, Hodneland E, Bukoreshtliev NV, Schlicker O & Gerdes HH. (2008). Tunneling nanotube (TNT)-like structures facilitate a constitutive, actomyosin-dependent exchange of endocytic organelles between normal rat kidney cells. *Exp Cell Res* **314**, 3669-3683.
- Gupta N & DeFranco AL. (2003). Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol Biol Cell* **14**, 432-444.
- Gustafson T & Wolpert L. (1967). Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. *Biol Rev Camb Philos Soc* **42**, 442-498.
- Gwadz RW. (1976). Successful immunization against the sexual stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Science* **193**, 1150-1151.

- Hadley T, Aikawa M & Miller LH. (1983). Plasmodium knowlesi: studies on invasion of rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors. *Exp Parasitol* **55**, 306-311.
- Haldar K, Murphy SC, Milner DA & Taylor TE. (2007). Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol* **2**, 217-249.
- Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* **41**, 95-98.
- Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S, Sawada J & Tanaka I. (1978). Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric Biol Chem* **42**, 523-528.
- Hanspal M, Dua M, Takakuwa Y, Chishti AH & Mizuno A. (2002). Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood* **100**, 1048-1054.
- Harris PK, Yeoh S, Dluzewski AR, O'Donnell RA, Withers-Martinez C, Hackett F, Bannister LH, Mitchell GH & Blackman MJ. (2005). Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathog* **1**, 241-251.
- Harwaldt P, Rahlfs S & Becker K. (2002). Glutathione S-transferase of the malarial parasite Plasmodium falciparum: characterization of a potential drug target. *Biol Chem* **383**, 821-830.
- Hay SI, Guerra CA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Noor AM, Kabaria CW, Manh BH, Elyazar IR, Brooker S, Smith DL, Moyeed RA & Snow RW. (2009). A world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2007. *PLoS Med* **6**.
- Hill J, Tyas L, Phylip LH, Kay J, Dunn BM & Berry C. (1994). High level expression and characterisation of Plasmepsin II, an aspartic proteinase from Plasmodium falciparum. *FEBS Lett* **352**, 155-158.
- Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ & Anders RF. (1996). The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* **271**, 29446-29452.
- Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacci J, de la Vega P, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LW, Sedegah M, Heppner DG, Ballou WR & Richie TL. (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites. *J Infect Dis* **185**, 1155-1164.
- Holzmueller P, Bras-Gonçalves R & Lemesre JL. (2006). Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania. *Parasitology* **132**, Suppl:S19-32.
- Hsiung F, Ramirez-Weber FA, Iwaki DD & Kornberg TB. (2005). Dependence of Drosophila wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature* **437**, 560-563.
- Hsu E. (2006). The history of quig hao in the Chinese materia medica. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100**, 505-508.
- Ifediba T & Vanderberg JP. (1981). Complete in vitro maturation of Plasmodium falciparum gametocytes. *Nature* **294**, 364-366.

- Janse CJ, Ponnudurai T, Lensen AH, Meuwissen JH, Ramesar J, Van der Ploeg M & Overdulve JP. (1988). DNA synthesis in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* **96**, 1-7.
- Janse CJ, Van der Klooster PF, Van der Kaay M, Van der Ploeg M & Overdulve JP. (1986). Rapid DNA replication during microgametogenesis and DNA synthesis in young zygotes of *Plasmodium berghei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **80**.
- Jeong JJ, Kumar A, Hanada T, Seo PS, Li X, Hanspal M & Chishti AH. (2006). Cloning and characterization of *Plasmodium falciparum* cysteine protease, falcipain-2B. *Blood Cells Mol Dis* **36**, 429-435.
- Jones TR & Hoffman SL. (1994). Malaria vaccine development. *Clin Microbiol Rev* **7**, 303-310.
- Kariuki MM, Kiara JK, Mula FK, Mwangi JK, Wasunna MK & Martin SK. (1998). *Plasmodium falciparum*: purification of the various gametocyte developmental stages from in vitro-cultivated parasites. *Am J Trop Med Hyg* **59**, 505-508.
- Karp GC & Solursh M. (1985). Dynamic activity of the filopodia of sea urchin embryonic cells and their role in directed migration of the primary mesenchyme in vitro. *Dev Biol* **112**, 276-283.
- Kaslow DC. (2002). Transmission-blocking vaccines. *Chem Immunol* **80**, 287-307.
- Kaslow DC, Quakyi IA, Syin C, Raum MG, Keister DB, Coligan JE, McCutchan TF & Miller LH. (1988). A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**, 74-76.
- Kaslow DC & 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.
- Kasteel DT, Perbal MC, Boyer JC, Wellink J, Goldbach RW, Maule AJ & van Lent JW. (1996). The movement proteins of cowpea mosaic virus and cauliflower mosaic virus induce tubular structures in plant and insect cells. *J Gen Virol* **77 (Pt 11)**, 2857-2864.
- Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, Ockenhouse CF, Krzych U, Moris P, Schwenk R, Nielsen RA, Debebe Z, Pinelis E, Juompan L, Williams JL, Dowler M, Stewart VA, Wirtz RA, Dubois MC, Lievens M, Cohen J, Ballou WR, Heppner DGJ & the RTS SVEG. (2009). Randomized, Double-Blind, Phase 2a Trial of Falciparum Malaria Vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in Malaria-Naive Adults: Safety, Efficacy, and Immunologic Associates of Protection. *J Infect Dis* **200**, 337-346.
- Khan SM, Franke-Fayard B, Mair GR, Lasonder E, Janse CJ, Mann M & Waters AP. (2005). Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell* **121**, 675-687.
- Kidani Y & Hirose J. (1977). Coordination chemical studies on metalloenzymes. II. Kinetic behavior of various types of chelating agents towards bovine carbonic anhydrase. *J Biochem* **81**, 1383-1391.
- Kirk K, Horner HA, Elford BC, Ellory JC & Newbold CI. (1994). Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J Biol Chem* **269**, 3339-3347.

- Kirschke H & Barrett AJ. (1987). in *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown* (Glaumann, H., and Ballard, J., eds). *Academic Press, Inc, London*, 192-238.
- Kiszewski A, Mellinger A, Spielman A, Malaney P, Sachs SE & Sachs J. (2004). A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* **70**, 486-498.
- Kitjaroentham A, Suthiphongchai T & Wilairat P. (2006). Effect of metalloprotease inhibitors on invasion of red blood cell by *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop* **97**, 5-9.
- Klemba M, Gluzman I & Goldberg DE. (2004). A *Plasmodium falciparum* Dipeptidyl Aminopeptidase I Participates in Vacuolar Hemoglobin Degradation. *J Biol Chem* **279**, 43000-43007.
- Klemba M & Goldberg DE. (2005). Characterization of plasmepsin V, a membrane-bound aspartic protease homolog in the endoplasmic reticulum of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **143**, 183-191.
- Kletzien RF, Perdue JF & Springer A. (1972). Cytochalasin A and B. Inhibition of sugar uptake in cultured cells. *J Biol Chem* **247**, 2964-2966.
- Kocken CH, Jansen J, Kaan AM, Beckers PJ, Ponnudurai T, Kaslow DC, Konings RN & Schoenmakers JG. (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.
- Kopito RR & Lodish HF. (1985). Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature* **316**, 234-238.
- Koussis K, Withers-Martinez C, Yeoh S, Child M, Hackett F, Knuepfer E, Juliano L, Woehlbier U, Bujard H & Blackman MJ. (2009). A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *EMBO J* **28**, 725-735.
- Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM & Dimmeler S. (2005). Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res* **96**, 1039-1041.
- Krishan A. (1972). Cytochalasin-B: time-lapse cinematographic studies on its effects on cytokinesis. *J Cell Biol* **54**, 657-664.
- Kühn A. (2007). Molekulare Wechselwirkungen von sexualstadienspezifischen Proteinen im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* und die Wirkung des Signalmoleküls Xanthurensäure während Befruchtungsvorgängen. Universität Würzburg, Würzburg.
- Kumar N. (1987). Target antigens of malaria transmission blocking immunity exist as a stable membrane bound complex. *Parasite Immunol* **9**, 321-335.
- Kumar N & Wize B. (1992). Further characterization of interactions between gamete surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **53**, 113-120.
- Kumar NM & Gilula NB. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388.
- Kumar S, Epstein JE, Richie TL, Nkrumah FK, Soisson L, Carucci DJ & Hoffman SL. (2002). A multilateral effort to develop DNA vaccines against *falciparum* malaria. *Trends Parasitol* **18**, 129-135.

- Lanfrancotti A, Bertuccini L, Silvestrini F & 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.
- Lang-Unnasch N & Murphy AD. (1998). Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host. *Annu Rev Microbiol* **52**, 561-590.
- Lauer S, VanWye J, Harrison T, McManus H, Samuel BU, Hiller NL, Mohandas N & Haldar K. (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *EMBO J* **19**, 3556-3564.
- Lauer SA, Rathod PK, Ghori N & Haldar K. (1997). A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* **276**, 1122-1125.
- Lavazec C & Bourgouin C. (2008). Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting Plasmodium development. *Microbes Infect* **10**, 845-849.
- Le Chat L, Sinden RE & Dessens JT. (2007). The role of metacaspase 1 in Plasmodium berghei development and apoptosis. *Mol Biochem Parasitol* **153**, 41-47.
- Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, Grainger M, Moch JK, Haynes JD, De La Vega P, Holder AA, Batalov S, Carucci DJ & Winzeler EA. (2003). Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* **301**, 1503-1508.
- Lehmann MJ, Sherer NM, Marks CB, Pypaert M & Mothes W. (2005). Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* **170**, 317-325.
- Letunic I, Doerks T & Bork P. (2009). SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **37**, D229-232.
- Levine ND. (1988). *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Liebau E, Bergmann B, Campbell AM, Teesdale-Spittle P, Brophy PM, Lüersen K & Walter RD. (2002). The glutathione S-transferase from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **124**, 85-90.
- Ling IT, Kaneko O, Narum DL, Tsuboi T, Howell S, Taylor HM, Scott-Finnigan TJ, Torii M & Holder AA. (2003). Characterisation of the rhoph2 gene of Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii. *Mol Biochem Parasitol* **127**, 47-57.
- Lingelbach K & Joiner KA. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* **111**, 1467-1475.
- Liu J, Gluzman IY, Drew ME & Goldberg DE. (2005). The role of Plasmodium falciparum food vacuole plasmepsins. *J Biol Chem* **280**, 1432-1437.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL & Darnell J. (2004a). Microfilaments and Intermediate Filaments. In *Molecular Cell Biology*, 5 edn, pp. 973. W.H. Freeman and Company, New York.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL & Darnell J. (2004b). Microtubules. In *Molecular Cell Biology*, pp. 973. W.H. Freeman and Company, New York.

- Löffler G. (2005). Das endokrine System. In *Basiswissen Biochemie*, 6. Auflage edn, pp. 508. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ludueno RF. (1979). Biochemistry of tubulin. In *Microtubules*, ed. Roberts K & Hyams JS, pp. 65-116. Academic Press, London.
- Lyke KE, Daou M, Diarra I, Kone A, Kouriba B, Thera MA, Dutta S, Lanar DE, Heppner DGJ, Doumbo OK, Plowe CV & Sztein MB. (2009). Cell-mediated immunity elicited by the blood stage malaria vaccine apical membrane antigen 1 in Malian adults: results of a Phase I randomized trial. *Vaccine* **27**, 2171-2176.
- Maier AG, Cooke BM, Cowman AF & Tilley L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol* **7**, 341-354.
- Maina CV, Riggs PD, Grandea AG, 3rd, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA & Guan CD. (1988). An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**, 365-373.
- Mair GR, Braks JA, Garver LS, Wiegant JC, Hall N, Dirks RW, Khan SM, Dimopoulos G, Janse CJ & Waters AP. (2006). Regulation of sexual development of Plasmodium by translational repression. *Science* **313**, 667-669.
- Malaisse WJ, Leclercq-Meyer V, Van Obberghen E, Somers G, Devis G, Ravazzola M, Malaisse-Lagae F & Orci L. (1975). The role of the microtubular-microfilamentous system in insulin and glucagon release by the endocrine pancreas. In *Microtubules and Microtubule Inhibitors*, ed. Borgers M & De Brabander M, pp. 143-152. McIntosh J.R., North Holland, Amsterdam.
- Marshall VM, Zhang L, Anders RF & Coppel RL. (1996). Diversity of the vaccine candidate AMA-1 of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **77**, 109-113.
- Mayer R, Picard I, Lawton P, Grellier P, Barrault C, Monsigny M & Schrével J. (1991). Peptide derivatives specific for a Plasmodium falciparum proteinase inhibit the human erythrocyte invasion by merozoites. *J Med Chem* **34**, 3029-3035.
- McGinnis S & Madden TL. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **32**, W20-25.
- McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ & Bouvier J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* **47**, 821-853.
- McRobert L, Taylor CJ, Deng W, Fivelman QL, Cummings RM, Polley SD, Billker O & Baker DA. (2008). Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. *PLoS Biol* **6**, e139.
- Meek TD, Dayton BD, Metcalf BW, Dreyer GB, Strickler JE, Gorniak JG, Rosenberg M, Moore ML, Magaard VW & Debouck C. (1989). Human immunodeficiency virus 1 protease expressed in Escherichia coli behaves as a dimeric aspartic protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1841-1845.
- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P & Carter R. (2001). The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* **64**, 97-106.
- Meshnick SR. (1997). Why Does Quinine Still Work After 350 Years of Use? *Parasitol Today* **13**, 89-90.

- Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, De Monbrison F, Kaiser K & Picot S. (2007). Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis* **195**, 1852-1859.
- Miller J, Fraser SE & McClay D. (1995). Dynamics of thin filopodia during sea urchin gastrulation. *Development* **121**, 2501-2511.
- Mizel SB & Wilson L. (1972). Inhibition of the transport of several hexoses in mammalian cells by cytochalasin B. *J Biol Chem* **247**, 4102-4105.
- Moormann AM, Sumba PO, Tisch DJ, Embury P, King CH, Kazura JW & John CC. (2009). Stability of interferon-gamma and interleukin-10 responses to *Plasmodium falciparum* liver stage antigen 1 and thrombospondin-related adhesive protein immunodominant epitopes in a highland population from Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* **81**, 3.
- Moorthy V, S, , Imoukhuede EB, Milliga P, Bojang K, Keating S, Kaye P, Pinder M, Gilbert SC, Walraven G, Greenwood BM & Hill AS. (2004). A randomised, double-blind, controlled vaccine efficacy trial of DNA/MVA ME-TRAP against malaria infection in Gambian adults. *PLoS Med* **1**, e33.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V & Rodríguez A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science* **291**, 141-144.
- Mottram JC, Helms MJ, Coombs GH & Sajid M. (2003). Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends Parasitol* **19**.
- Mueller AK, Labaied M, Kappe SH & Matuschewski K. (2005). Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* **433**, 164-167.
- Mueller I, Zimmerman PA & Reeder JC. (2007). *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*--the "bashful" malaria parasites. *Trends Parasitol* **23**, 278-283.
- Murphy SC, Samuel BU, Harrison T, Speicher KD, Speicher DW, Reid ME, Prohaska R, Low PS, Tanner MJ, Mohandas N & Haldar K. (2004). Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood* **103**, 1920-1928.
- Nantulya FN, Kengeya-Kayondo JF & Ogundahunsi OA. (2007). Research themes and advances in malaria research capacity made by the Multilateral Initiative on Malaria. *Am J Trop Med Hyg* **77**, 303-313.
- Narum DL & Thomas AW. (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.
- Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C & Pérez JM. (2004). Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? *Trends Parasitol* **20**, 375-380.
- Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H & Orton C. (1967). Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *plasmodium berghei*. *Nature* **216**, 160-162.

- Ogutu BR, Apollo OJ, McKinney D, Okoth W, Siangla J, Dubovsky F, Tucker K, Waitumbi JN, Diggs C, Wittes J, Malkin E, Leach A, Soisson LA, Milman JB, Otieno L, Holland CA, Polhemus M, Remich SA, Ockenhouse CF, Cohen J, Ballou WR, Martin SK, Angov E, Stewart VA, Lyon JA, Heppner DG, Withers MR & Group. tM-MVW. (2009). Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS One* **4**, e4708.
- Okamoto N, Spurck TP, Goodman CD & McFadden GI. (2009). Apicoplast and Mitochondrion in Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* **8**, 128-132.
- Olaya P & Wasserman M. (1991). Effect of calpain inhibitors on the invasion of human erythrocytes by the parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochim Biophys Acta* **10967**, 217-221.
- Olson JE, Lee GK, Semenov A & Rosenthal PJ. (1999). Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors. *Bioorg Med Chem* **7**, 633-638.
- Omara-Opyene AL, Moura PA, Sulsona CR, Bonilla JA, Yowell CA, Fujioka H, Fidock DA & Dame JB. (2004). Genetic disruption of the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole plasmepsins demonstrates their functional redundancy. *J Biol Chem* **279**, 54088-54096.
- Önfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, Seabra MC, Neil MA, French PM & Davis DM. (2006). Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* **177**, 8476-8483.
- Önfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K & Davis DM. (2004). Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* **173**, 1511-1513.
- Orlean P & Menon AK. (2007). GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycospholipids. *J Lipid Res* **48**, 993-1011.
- Otto H-H & Schirmeister T. (1997). Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem Rev* **97**, 133-171.
- Outchkourov NS, Roeffen W, Kaan A, Jansen J, Luty A, Schuiffel D, van Gemert GJ, van de Vegte-Bolmer M, Sauerwein RW & Stunnenberg HG. (2008). Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4301-4305.
- Pan W, Ravot E, Tolle R, Frank R, Mosbach R, Türbachova I & Bujard H. (1999). Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum*: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **27**, 1094-1103.
- Parvanova I, Epiphonio S, Fauq A, Golde TE, Prudêncio M & Mota MM. (2009). A small molecule inhibitor of signal peptide peptidase inhibits *Plasmodium* development in the liver and decreases malaria severity. *PLoS One* **4**, e5078.
- Perrin BJ & Huttenlocher A. (2002). Calpain. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 722-725.

- Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, Crewther PE, Lew A, Silva A, Anders RF & Kemp DJ. (1989). Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* **9**, 3151-3154.
- Pichyangkul S, Gettayacamin M, Miller RS, Lyon JA, Angov E, Tongtawe P, Ruble DL, Heppner DGJ, Kester KE, Ballou WR, Diggs CL, Voss G, Cohen JD & Walsh DS. (2004). Pre-clinical evaluation of the malaria vaccine candidate *P. falciparum* MSP1(42) formulated with novel adjuvants or with alum. *Vaccine* **22**, 3831-3840.
- Piperno G & Fuller MT. (1985). Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J Cell Biol* **101**, 2085-2094.
- Ponnudurai T, Leeuwenberg AD & Meuwissen JH. (1981). Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to in vitro culture. *Trop Geogr Med* **33**, 50-54.
- Ponnudurai T, Lensen AH, Van Gemert GJ, Bensink MP, Bolmer M & Meuwissen JH. (1989). Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology* **98 Pt 2**, 165-173.
- Ponpuak M, Klemba M, Park M, Gluzman IY, Lamma GK & Goldberg DE. (2007). A role for falcilysin in transit peptide degradation in the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Mol Microbiol* **63**, 314-334.
- Ponzi M, Sidén-Kiamos I, Bertuccini L, Currà C, Kroeze H, Camarda G, Pace T, Franke-Fayard B, Laurentino EC, Louis C, Waters AP, Janse CJ & Alano P. (2009). Egress of *Plasmodium berghei* gametes from their host erythrocyte is mediated by the MDV-1/PEG3 protein. *Cell Microbiol* **11**, 1272-1288.
- Poulos TL, Alden RA, Freer ST, Birktoft JJ & Kraut J. (1976). Polypeptide halomethyl ketones bind to serine proteases as analogs of the tetrahedral intermediate. X-ray crystallographic comparison of lysine- and phenylalanine-polypeptide chloromethyl ketone-inhibited subtilisin. *J Biol Chem* **251**, 1097-1103.
- Powers JC, Asgian JL, Ekici ÖD & James KE. (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, Hayton K, Aravind L, Iyer LM, Abrahamsen MS, Bonawitz A, Mejia C & Templeton TJ. (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, Rupp I, Sologub L, Scheuermayer M, Reininger L, Doerig C, Eksi S, Kombila DU, Frank M & Williamson KC. (in Revision). Malaria parasites form filamentous cell-to-cell connections during reproduction in the mosquito midgut. *Cell Research*.
- Pradel G, Wagner C, Mejia C & Templeton TJ. (2006). *Plasmodium falciparum*: Co-dependent expression and co-localization of the PfCCp multi-adhesion domain proteins. *Exp Parasitol* **112**, 263-268.
- Purcell LA, Yanow SK, Lee M, Spithill TW & Rodriguez A. (2008). Chemical attenuation of *Plasmodium berghei* sporozoites induces sterile immunity in mice. *Infect Immun* **76**, 1193-1199.

- Quakyi IA, Carter R, Rener J, Kumar N, Good MF & Miller LH. (1987). The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. *J Immunol* **139**, 4213-4217.
- Raghunathan A, Sivakamasundari R, Wolenski J, Poddar R & Weissman SM. (2001). Functional analysis of B144/LST1: a gene in the tumor necrosis factor cluster that induces formation of long filopodia in eukaryotic cells. *Exp Cell Res* **268**, 230-244.
- Rangarajan R, Bei AK, Jethwaney D, Maldonado P, Dorin D, Sultan AA & Doerig C. (2005). A mitogen-activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep* **6**, 464-469.
- Raine JD, Ecker A, Mendoza J, Tewari R, Stanway RR & Sinden RE. (2007). Female inheritance of malarial lap genes is essential for mosquito transmission. *PLoS Pathog* **3**, e30.
- Ramirez-Weber FA & Kornberg TB. (1999). Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **97**, 599-607.
- Raucher D & Sheetz MP. (1999). Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophys J* **77**, 1992-2002.
- Rawlings DJ, Fujioka H, Fried M, Keister DB, Aikawa M & Kaslow DC. (1992). Alpha-tubulin II is a male-specific protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **56**, 239-250.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J & Barrett AJ. (2008). *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **36**, D320-325.
- Reininger L, Tewari R, Fennell C, Holland Z, Goldring D, Ranford-Cartwright L, Billker O & Doerig C. (2009). An essential role for the *Plasmodium* Nek-2 Nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. *J Biol Chem* **284**, 20858-20868.
- Rener J, Graves PM, Carter R, Williams JL & Burkot TR. (1983). Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* **158**, 976-981.
- Resh MD. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 1-16.
- Reungrapavut S, Krungkrai SR & Krungkrai J. (2004). *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase is a possible target for malaria chemotherapy. *J Enzyme Inhib Med Chem* **19**, 249-256.
- Reyes-Sandoval A, Sridhar S, Berthoud T, Moore AC, Harty JT, Gilbert SC, Gao G, Ertl HC, Wilson JC & Hill AV. (2008). Single-dose immunogenicity and protective efficacy of simian adenoviral vectors against *Plasmodium berghei*. *Eur J Immunol* **38**, 732-741.
- Robbins JR, Barth AI, Marquis H, de Hostos EL, Nelson WJ & Theriot JA. (1999). *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J Cell Biol* **146**, 1333-1350.
- Rodrigues EG, Zavala F, Eichinger D, Wilson JM & Tsuji M. (1997). Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8+ T cell-mediated protective immunity against malaria. *J Immunol* **158**, 1268-1274.

- Roggwiller E, Fricaud AC, Blisnick T & Braun-Breton C. (1997). Host urokinase-type plasminogen activator participates in the release of malaria merozoites from infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* **86**, 49-59.
- Romoser WS. (1996). The Vector Alimentary System. In *The Biology of Disease Vectors*, ed. Beaty BJ & Marquardt WC, pp. 298-321. University Press of Colorado, Colorado.
- Rosenthal PJ. (1998). Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. *Emerg Infect Dis* **4**, 49-57.
- Rosenthal PJ. (1999). Proteases of protozoan parasites. *Adv Parasitol* **43**, 105-159.
- Rosenthal PJ. (2001). Protease Inhibitors. In *Antimalarial Chemotherapy- Mechanism of Action, Resistance and New Directions in Drug Discovery*, ed. Rosenthal PJ, pp. 400. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Rosenthal PJ. (2004). Cysteine proteases of malaria parasites. *Int J Parasitol* **34**, 1489-1499.
- Rosenthal PJ, Lee GK & Smith RE. (1993). Inhibition of a Plasmodium vinckei cysteine proteinase cures murine malaria. *J Clin Invest* **91**, 1052-1056.
- Rosenthal PJ, McKerrow JH, Aikawa M, Nagasawa H & Leech JH. (1988). A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by Plasmodium falciparum. *J Clin Invest* **82**, 1560-1566.
- Rupp I, Bosse R, Schirmeister T & Pradel G. (2008). Effect of protease inhibitors on exflagellation in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **158**, 208-212.
- Russo I, Oksman A & Goldberg DE. (2009a). Fatty acid acylation regulates trafficking of the unusual Plasmodium falciparum calpain to the nucleolus. *Mol Microbiol* **72**, 229-245.
- Russo I, Oksman A, Vaupel B & Goldberg DE. (2009b). A calpain unique to alveolates is essential in Plasmodium falciparum and its knockdown reveals an involvement in pre-S-phase development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1554-1559.
- Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P & Gerdes HH. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **303**, 1007-1010.
- Sacarlal S, Aide P, Aponte JJ, Renom M, Leach A, Mandomando I, Lievens M, Bassat Q, Lafuente S, Macete E, Vekemans J, Guinovart C, Sigau' que B, Sillman M, Milman J, Dubois M-C, Demoitie' M-A, Thonnard J, Mene' ndez C, Ballou WR, Cohen J & Alonso PL. (2009). Long-Term Safety and Efficacy of the RTS,S/AS02A Malaria Vaccine in Mozambican Children. *J Infect Dis* **200**, 329-336.
- Sajid M, Withers-Martinez C & Blackman MJ. (2000). Maturation and specificity of Plasmodium falciparum subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. *J Biol Chem* **275**, 631-641.
- Saliba KJ & Kirk K. (1998). Uptake of an antiplasmodial protease inhibitor into Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes via a parasite-induced pathway. *Mol Biochem Parasitol* **94**, 297-301.
- Salmon BL, Oksman A & Goldberg DE. (2001). Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 271-276.

- Salvesen GS & Nagase H. (2001). Inhibition of proteolytic enzymes. In *Proteolytic enzymes: a practical approach*, Zweite Auflage edn, ed. Bond JS & Beynon RJ, pp. 105-130. Oxford University Press, Oxford.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sarda V, Kaslow DC & Williamson KC. (2009). Approaches to Malaria Vaccine Development using the Retrospectroscope. *Infect Immun* **Epub ahead of print**.
- Saul A. (2007). Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. *Curr Opin Infect Dis* **20**, 476-481.
- Scalzi HA & Bahr GF. (1968). An electron microscopic examination of erythrocytic stages of two rodent malarial parasites, *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium vinckei*. *J Ultrastruct Res* **24**, 116-133.
- Schlitzer M. (2007). Malaria chemotherapeutics part I: history of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drug in clinical development. *Chem Med Chem* **9**, 944-986.
- Schmidt-Christensen A, Sturm A, Horstmann S & Heussler VT. (2008). Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stages. *Cell Microbiol* **10**, 1723-1734.
- Schmidtke DW & Diamond SL. (2000). Direct observation of membrane tethers formed during neutrophil attachment to platelets or P-selectin under physiological flow. *J Cell Biol* **149**, 719-730.
- Schneider J & Kent SB. (1988). Enzymatic activity of a synthetic 99 residue protein corresponding to the putative HIV-1 protease. *Cell* **29**, 363-368.
- Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, Otieno S, van de Vegte-Bolmer M, Omar SA & Sauerwein RW. (2007). Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg* **76**, 470-474.
- Schoellmann G & Shaw E. (1963). Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochemistry* **2**, 252-255.
- Scholz SM. (2007). Analyse von zellulären und molekularen Wechselwirkungen der PfCCp-Multiadhäsionsdomänenproteine und funktionale Charakterisierung von PfCCp4 in den Sexualstadien des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*. Dissertation, pp. 165; am Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg; URN: urn:nbn:de:bvb:20-opus-26911, URL: <http://www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2008/2691/>.
- Scholz SM, Simon N, Lavazec C, Dude MA, Templeton TJ & Pradel G. (2008). PfCCp proteins of *Plasmodium falciparum*: Gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *Int J Parasitol* **38**, 327-340.
- Schrevel J, Grellier P, Mayer R & Monsigny M. (1988). Neutral proteases involved in the reinvasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Biol Cell* **64**, 233-244.
- Schüler H & Matuschewski K. (2006). Regulation of apicomplexan microfilament dynamics by a minimal set of actin-binding proteins. *Traffic* **7**, 1433-1439.

- Schüler H, Mueller AK & Matuschewski K. (2005). Unusual properties of Plasmodium falciparum actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS Lett* **579**, 655-660.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P & Ponting CP. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864.
- Schulz F, Gelhaus C, Degel B, Vicik R, Heppner S, Breuning A, Leippe M, Gut J, Rosenthal PJ & Schirmeister T. (2007). Screening of Protease Inhibitors as Antiplasmodial Agents. Part I: Aziridines and Epoxides. *ChemMedChem* **2**, 1214-1224.
- Semenov A, Olson JE & Rosenthal PJ. (1998). Antimalarial synergy of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2254-2258.
- Shaw E. (1990). Cysteinyln proteinases and their selective inactivation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **63**, 271-347.
- Shaw E, Mares-Guia M & Cohen W. (1965). Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the chloromethyl ketone derived from Nalpha-tosyl-L-lysine. *Biochemistry* **4**, 2219-2224.
- Shekalaghe S, Drakeley C, Gosling R, Ndaro A, van Meegeren M, Enevold A, Alifrangis M, Mosha F, Sauerwein R & Bousema T. (2007). Primaquine clears submicroscopic Plasmodium falciparum gametocytes that persist after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine and artesunate. *PLoS One* **2**, e1023.
- Shenai BR, Sijwali PS, Singh A & Rosenthal PJ. (2000). Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **275**, 29000-29010.
- Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Horensavitz C, Pypaert M & Mothes W. (2007). Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell Biol* **9**, 310-315.
- Sherer NM & Mothes W. (2008). Cytonemes and tunneling nanotubes in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol* **18**, 414-420.
- Sherman IW. (1979). Biochemistry of Plasmodium (malarial parasites). *Microbiol Rev* **43**, 453-495.
- Sidhu AB, Valderramos SG & Fidock DA. (2005). pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **57**, 913-926.
- Siemering KR, Golbik R, Sever R & Haseloff J. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr Biol* **6**, 1653-1663.
- Sijwali PS, Kato K, Seydel KB, Gut J, Lehman J, Klemba M, Goldberg DE, Miller LH & Rosenthal PJ. (2004). Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8721-8726.
- Sijwali PS & Rosenthal PJ. (2004). Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4384-4389.

- Sijwali PS, Shenai BR, Gut J, Singh A & Rosenthal PJ. (2001). Expression and characterization of the Plasmodium falciparum haemoglobinase falcipain-3. *Biochem J* **360**, 481-489.
- Silvestrini F, Alano P & Williams JL. (2000). Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Parasitology* **121 (Bd.5)**, 465-471.
- Silvestrini F, Bozdech Z, Lanfrancotti A, Di Giulio E, Bultrini E, Picci L, Derisi JL, Pizzi E & Alano P. (2005). Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **143**, 100-110.
- Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, Rubinstein E, Hannoun L, Charoenvit Y, Kocken CH, Thomas AW, Van Gemert GJ, Sauerwein RW, Blackman MJ, Anders RF, Pluschke G & Mazier D. (2004). A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites. *J Biol Chem* **279**, 9490-9496.
- Simmons D, Woollett G, Bergin-Cartwright M, Kay D & Scaife J. (1987). A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte. *EMBO J* **6**, 485-491.
- Simon N, Scholz SM, Moreira C, Templeton TJ, Kuehn A, Dude MA & Pradel G. (2009). Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **284**, 14537-46.
- Simonetti AB. (1996). The Biology of Malarial Parasite in the Mosquito - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**, 519-541.
- Sinden RE. (1984). The biology of *Plasmodium* in the mosquito. *Experientia* **40**, 1330-1343.
- Sinden RE. (1989). Recent advances in the parasitology of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **83**, 3-9.
- Sinden RE, Canning EU, Bray RS & Smalley ME. (1978). Gametocyte and gamete development in Plasmodium falciparum. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **201**, 375-399.
- Sinden RE, Canning EU & Spain BJ. (1976). Gametogenesis and fertilization in Plasmodium yoelii nigeriensis: a transmission electron microscope study. *Proceedings of the Royal Society of London B* **193**, 55-76.
- Sinden RE, Hartley RH & King NJ. (1985). Gametogenesis in Plasmodium; the inhibitory effects of anticytoskeletal agents. *Int J Parasitol* **15**, 211-217.
- Singh N, Sijwali PS, Pandey KC & Rosenthal PJ. (2006). Plasmodium falciparum: biochemical characterization of the cysteine protease falcipain-2'. *Exp Parasitol* **112**, 187-192.
- Sirima SB, Nébié I, Ouédraogo A, Tiono AB, Konaté AT, Gansané A, Dermé AI, Diarra A, Ouédraogo A, Soulama I, Cuzzin-Ouattara N, Cousens S & Leroy O. (2007). Safety and immunogenicity of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-3 long synthetic peptide (MSP3-LSP) malaria vaccine in healthy, semi-immune adult males in Burkina Faso, West Africa. *Vaccine* **25**, 2723-2732.
- Smalley ME, Abdalla S & Brown J. (1980). The distribution of Plasmodium falciparum in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **75**, 103-105.

- Smalley ME & Sinden RE. (1977). Plasmodium falciparum gametocytes their longevity and infectivity. *Parasitology* **74**, 1-8.
- Smith TG, Lourenco P, Carter R, Walliker D & Ranford-Cartwright LC. (2000). Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Parasitology* **121 (Bd.2)**, 127-133.
- Snow RW & Omumbo JA. (2006). Malaria. In *Disease and mortality in Sub-Saharan Africa*, Zweite Ausgabe edn, ed. Jamison DT, Feachem RG, Makgoba MW, Bos ER, Baingana FK, Hofman KJ & Rogo KO, pp. 195-213. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, Washington, D.C.
- Solomon DH, O'Brian CA & Weinstein IB. (1985). N-alpha-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone and N-alpha-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone inhibit protein kinase C. *FEBS Lett* **190**, 342-344.
- Soni S, Dhawan S, Rosen KM, Chafel M, Chishti AH & Hanspal M. (2005). Characterization of events preceding the release of malaria parasite from the host red blood cell. *Blood Cells Mol Dis* **35**, 201-211.
- Sorimachi H, Ishiura S & Suzuki K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* **328**, 721-732.
- Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Kohler K, Oddos S, Eissmann P, Brodsky FM, Hopkins C, Onfelt B, Sattentau Q & Davis DM. (2008). Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* **10**, 211-219.
- Spector I, Shochet NR, Blasberger D & Kashman Y. (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* **13**, 127-144.
- Spielmann T, Ferguson DJ & Beck HP. (2003). etramps, a new Plasmodium falciparum gene family coding for developmentally regulated and highly charged membrane proteins located at the parasite-host cell interface. *Mol Biol Cell* **14**, 1529-1544.
- Stewart MJ & Vanderberg JP. (1988). Malaria sporozoites leave behind trails of circumsporozoite protein during gliding motility. *J Protozool* **35**, 389-393.
- Stewart MJ & Vanderberg JP. (1991). Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. *J Protozool* **38**, 411-421.
- Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S & Griffith GM. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* **15**, 751-761.
- Stocks PA, Raynes KJ & Ward SA. (2001). The History of Antimalarial Drugs. In *Antimalarial Chemotherapy: Mechanism of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery*, ed. Rosenthal PJ, pp. 235-253. Humana Press Inc., Totowa.
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R & Heussler VT. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **313**, 1287-1290.
- Sturm A & Heussler V. (2007). Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic Plasmodium parasites. *Med Microbiol Immunol* **196**, 127-133.

- Subramanian S, Hardt M, Choe Y, Niles RK, Johansen EB, Legac J, Gut J, Kerr ID, Craik CS & Rosenthal PJ. (2009). Hemoglobin cleavage site-specificity of the *Plasmodium falciparum* cysteine proteases falcipain-2 and falcipain-3. *PLoS One* **4**, 1-10.
- Suda H, Aoyagi T, Hamada M, Takeuchi T & Umezawa H. (1972). Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *J Antibiot* **25**, 263-266.
- Sultan AA, Thathy V, Frevort U, Robson KJ, Crisanti A, Nussenzweig V, Nussenzweig RS & Ménard R. (1997). TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell* **90**, 511-522.
- Talisuna AO, Bloland P & D'Alessandro U. (2004). History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clin Microbiol Rev* **17**, 235-254.
- Talman AM, Domarle O, McKenzie FE, Ariey F & Robert V. (2004). Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* **3**.
- Tamai M, Matsumoto K, Omura S, Koyama I, Ozawa Y & Hanada K. (1986). In vitro and in vivo inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64. *J Pharmacobiodyn* **9**, 672-677.
- Tang J. (1971). Specific and irreversible inactivation of pepsin by substrate-like epoxides. *J Biol Chem* **246**, 4510-4517.
- Templeton TJ, Fujioka H, Aikawa M, Parker KC & Kaslow DC. (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.
- Tewari R, Dorin D, Moon R, Doerig C & 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.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Thomson JG & Robertson A. (1935). The structure and development of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the internal organs and peripheral circulation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **29**, 31-40.
- Thornberry NA & Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, van Lin LH, de Koning-Ward TF, Sinha R, Lupetti P, Beetsma AL, Rodriguez MC, Karras M, Hager A, Mendoza J, Butcher GA, Kafatos FC, Janse CJ, Waters AP & Sinden RE. (2001). P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J* **20**, 3975-3983.
- Tomasselli AG & Henrikson RL. (2000). Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 189-214.
- Torres JA, Rodriguez MH, Rodriguez MC & de la Cruz Hernandez-Hernandez F. (2005). *Plasmodium berghei*: effect of protease inhibitors during gametogenesis and early zygote development. *Exp Parasitol* **111**, 255-259.

- Toyé PJ, Sinden RE & Canning EU. (1977). The action of metabolic inhibitors on microgametogenesis in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Z Parasitenkd* **53**, 133-141.
- Trager W & Jensen JB. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673-675.
- Trueman HE, Raine JD, Florens L, Dessens JT, Mendoza J, Johnson J, Waller CC, Delrieu I, Holders AA, Langhorne J, Carucci DJ, Yates JRr & Sinden RE. (2004). Functional characterization of an LCCL-lectin domain containing protein family in *Plasmodium berghei*. *J Parasitol* **90**, 1062-1071.
- Tsuji M & Zavala F. (2001). Peptide-based subunit vaccines against pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Mol Immunol* **38**, 433-442.
- Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M & Takeuchi T. (1970). Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *J Antibiot* **23**, 259-262.
- Umezawa S, Tatsuta K, Fujimoto K, Tsuchiya T, Umezawa H & Naganawa H. (1972). Structure of antipain, a new Sakaguchi-positive product of *Streptomyces*. *J Antibiot* **25**, 267-270.
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV & Dixit VM. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell Biol* **6**, 961-967.
- van Dijk MR, Janse CJ, Thompson J, Waters AP, Braks JA, Dodemont HJ, Stunnenberg HG, van Gemert GJ, Sauerwein RW & Eling W. (2001). A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell* **104**, 153-164.
- Vanderberg JP, Rhodin J & Yoeli M. (1967). Electron microscopical and histochemical studies of sporozoite formation in *Plasmodium berghei*. *J Protozool* **14**.
- VanWye JD & Haldar K. (1997). Expression of green fluorescent protein in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **87**, 225-229.
- Vermeulen AN, Ponnudurai T, Beckers PJ, Verhave JP, Smits MA & Meuwissen JH. (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 AN, van Deursen J, Brakenhoff RH, Lensen TH, Ponnudurai T & Meuwissen JH. (1986). Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. *Mol Biochem Parasitol* **20**, 155-163.
- von Itzstein M, Plebanski M, Cooke BM & Coppel RL. (2008). Hot, sweet and sticky: the glycobiology of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* **24**, 210-218.
- Watkins SC & Salter RD. (2005). Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity* **23**, 309-318.
- Weiss WR, Kumar A, Jiang G, Williams J, Bostick A, Conteh S, Fryauff D, Aguiar J, Singh M, O'Hagan DT, Ulmer JB & Richie TL. (2007). Protection of rhesus monkeys by a DNA prime/poxvirus boost malaria vaccine depends on optimal DNA priming and inclusion of blood stage antigens. *PLoS One* **2**, e1063.

- Welburn SC, Macleod E, Figarella K & Duzensko M. (2006). Programmed cell death in African trypanosomes. *Parasitology* **132**, Suppl:S7-S18.
- Wesseling JG, Smits MA & Schoenmakers JG. (1988). Extremely diverged actin proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **30**, 143-153.
- Wesseling JG, Snijders PJ, van Someren P, Jansen J, Smits MA & Schoenmakers JG. (1989). Stage-specific expression and genomic organization of the actin genes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **35**, 167-176.
- Whitaker JR & Perez-Villasenor J. (1968). Chemical modification of papain. I. Reaction with the chloromethyl ketones of phenylalanine and lysine and with phenylmethyl-sulfonyl fluoride. *Arch Biochem Biophys* **124**, 70-78.
- White NJ. (1999). Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parassitologia* **41**, 301-308.
- White NJ. (2008). *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* **46**, 172-173.
- World Health Organization (2000). Malaria transmission blocking vaccines: an ideal public good. 1-16 . Zugänglich unter: http://www.who.int/vaccine_research.
- World Health Organization (2007). Resistance to artemisinin derivatives along the Thai-Cambodian border. *Weekly epidemiological record* **82**, 357-360.
- World Health Organization (2008). World malaria report 2008. Zugänglich unter: <http://www.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008pdf>.
- World Health Organization (2009). Fact sheet N°94. Zugänglich unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>
- Wickham ME, Culvenor JG & Cowman AF. (2003). Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte. *J Biol Chem* **278**, 37658-37663.
- Williamson KC, Criscio MD & Kaslow DC. (1993). Cloning and expression of the gene for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen, Pfs230. *Mol Biochem Parasitol* **58**, 355-358.
- Williamson KC, Fujioka H, Aikawa M & Kaslow DC. (1996). Stage-specific processing of Pfs230, a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. *Mol Biochem Parasitol* **78**, 161-169.
- Williamson KC, Keister DB, Muratova O & Kaslow DC. (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.
- Winograd E, Clavijo CA, Bustamante LY & Jaramillo M. (1999). Release of merozoites from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes could be mediated by a non-explosive event. *Parasitol Res* **85**, 621-624.
- Withers-Martinez C, Jean L & Blackman MJ. (2004). Subtilisin-like proteases of the malaria parasite. *Mol Microbiol* **53**, 55-63.

- Withers-Martinez C, Saldanha JW, Ely B, Hackett F, O'Connor T & Blackman MJ. (2002). Expression of recombinant Plasmodium falciparum subtilisin-like protease-1 in insect cells. Characterization, comparison with the parasite protease, and homology modeling. *J Biol Chem* **277**, 29698-29709.
- Withers MR, McKinney D, Ogutu BR, Waitumbi JN, Milman JB, Apollo OJ, Allen OG, Tucker K, Soisson LA, Diggs C, Leach A, Wittes J, Dubovsky F, Stewart VA, Remich SA, Cohen J, Ballou WR, Holland CA, Lyon JA, Angov E, Stoute JA, Martin SK, Heppner DGJ & Group. M-MVW. (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.
- Wlodawer A, Miller M, Jaskólski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IT, Selk LM, Clawson L, Schneider J & Kent SB. (1989). Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* **245**, 616-621.
- Wlodawer A & Vondrasek J. (1998). Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**, 249-284.
- Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, Fontes E, Malkin EM, Mahanty S, Fay MP, Narum D, Rausch K, Miles AP, Aebig J, Orcutt A, Muratova O, Song G, Lambert L, Zhu D, Miura K, Long C, Saul A, Miller LH & Durbin AP. (2008). Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* **3**, e2636.
- Wu Y, Kirkman LA & Wellems TE. (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, Sifri CD, Lei HH, Su XZ & Wellems TE. (1995). Transfection of Plasmodium falciparum within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 973-977.
- Wu Y, Wang X, Liu X & Wang Y. (2003). Data-mining approaches reveal hidden families of proteases in the genome of malaria parasite. *Genome Res* **13**, 601-616.
- Yanow SK, Purcell LA, Pradel G, Sato A, Rodriguez A, Lee M & Spithill TW. (2008). Potent antimalarial and transmission-blocking activities of centanamycin, a novel DNA-binding agent. *J Infect Dis* **197**, 527-534.
- Yeoh S, O'Donnell RA, Koussis K, Dluzewski AR, Ansell KH, Osborne SA, Hackett F, Withers-Martinez C, Mitchell GH, Bannister LH, Bryans JS, Kettleborough CA & Blackman MJ. (2007). Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* **131**, 1072-1083.
- Yoshida N, Nussenzweig RS, Potocnjak P, Nussenzweig V & Aikawa M. (1980). Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science* **207**, 71-73.
- Zangger H, Mottram JC & Fasel N. (2002). Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* **9**, 1126-1139.
- Zhu D, Tan KS, Zhang X, Sun AY, Sun GY & Lee JC. (2005). Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J Cell Sci* **118**, 3695-3703.