

**Charakterisierung von Membranproteinen
der invasiven Stadien des Malariaerregers
*Plasmodium falciparum***

WELCH, 1897

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Saskia Viebig

Kiel, März 2011

Referent: Prof. Dr. Matthias Leippe

Koreferent: Prof. Dr. Paul Saftig

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Mai 2011

Zum Druck genehmigt: 6. Mai 2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung	10
1.1 Malaria	10
1.2 Lebenszyklus <i>Plasmodium</i>	11
1.3 Invasion der Merozoiten in die Erythrocyten.....	13
1.3.1 Die Merozoiten	13
1.3.2 Invasion von Erythrocyten.....	15
1.3.3 Alternative Invasionswege von <i>P. falciparum</i>	20
1.3.4 Impfstoffentwicklung und natürlich auftretende Immunität	24
1.4 Identifizierung bisher unbekannter Merozoiten-Proteine aus <i>P. falciparum</i>	26
1.4.1 Pf14.....	26
1.4.2 Pf15.....	27
1.4.3 Pf38.....	28
1.4.4 Pf117.....	30
1.5 Zielsetzung.....	32
2 Material	33
2.1 Chemikalien	33
2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	36
2.3 Allgemeine Pufferlösungen und Medien	38
2.4 Größenstandards für die Elektrophorese.....	38
2.5 Enzyme.....	38
2.6 Vektoren.....	39
2.7 Kits	39
2.8 Synthetische Peptide.....	39
2.9 Antikörper und Immunisierungspeptide	39

2.10 Primer.....	41
3 Methoden.....	42
3.1 Führung einer <i>Plasmodium falciparum</i> -Kultur.....	42
3.1.1 <i>Plasmodium falciparum</i> -Stämme und Erythrocyten	42
3.1.2 <i>In-Vitro</i> -Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> FCBR.....	42
3.1.3 Mikroskopische Darstellung von <i>P. falciparum</i> mittels Giemsa-Färbung	43
3.1.4 Einfrieren von Plasmodien.....	44
3.1.5 Auftauen von Plasmodien	44
3.1.6 Synchronisation einer <i>P. falciparum</i> -Kultur mit D-Sorbitol.....	45
3.1.7 Anreicherung von <i>P. falciparum</i> FCBR-Trophozoiten über Gelafundin	45
3.1.8 Anreicherung von Schizonten über Percoll.....	46
3.1.9 Isolierung von Merozoiten.....	46
3.2 Membranpräparation von infizierten Erythrocyten und Merozoiten	47
3.3 Elektroporation von <i>P. falciparum</i> 3D7.....	48
3.4 GFP- <i>Live Imaging</i>	49
3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie	49
3.6 Isolierung von RNA aus <i>P. falciparum</i>	50
3.7 cDNA-Erststrangsynthese durch reverse Transkription.....	50
3.8 Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR).....	51
3.9 Agarose-Gelelektrophorese	52
3.10 Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	52
3.11 Restriktion von DNA.....	53
3.12 Ligation.....	53
3.12.1 Direkte Ligation von PCR-Produkten in pDRIVE und pJET1.2.....	53
3.12.2 Ligation von Expressionsvektoren	53
3.13 Herstellung hitzekompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	54
3.14 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	54

3.15 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	55
3.16 Sequenzierung von DNA	55
3.17 Herstellung und Reinigung von Pf15N in <i>E. coli</i>	55
3.17.1 Klonierung des Expressionsvektors pGEX2T-Pf15N	56
3.17.2 Expression von GST-Pf15N in <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>trxB</i>	57
3.17.3 Affinitätschromatografie mit Glutathion-Sepharose.....	57
3.17.4 Abspaltung des GST-Anhanges mit Thrombin	58
3.17.5 Anionenaustauschchromatografie.....	58
3.17.6 Protein-Konzentrierung über eine hydrophobe Matrix (SepPak)	58
3.18 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	59
3.18.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	59
3.18.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Test	59
3.18.3 Proteinbestimmung bei 280 nm	60
3.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
3.19.1 Reduktion und Alkylierung von Proteinen	60
3.19.2 Elektrophorese.....	61
3.20 Färbung von Proteinen im Gel.....	63
3.20.1 Proteinfärbung mit kolloidaler Coomassie-Lösung.....	63
3.20.2 Proteinfärbung mit Silbernitrat.....	64
3.21 Massenspektrometrische Analyse	65
3.21.1 Vorbereitung der Proben.....	65
3.21.2 Durchführung der massenspektrometrischen Analyse	65
3.22 Western Transfer von Proteinen auf eine Membran	66
3.22.1 <i>Semi Dry Blotting</i>	66
3.22.2 <i>Tank Blot</i> -Verfahren	67
3.22.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Membran	68
3.23 Reinigung von Antikörpern mittels Affinitätschromatografie	68
3.23.1 Reinigung von IgG über eine HiTrap Protein A-Säule.....	68

3.23.2	Reinigung von IgG mittels Thiol-Sepharose gekoppelter Peptide.....	69
3.24	Viabilitäts-Assay mit SYTOX [®] <i>Green</i>	70
3.25	Invasions-Assays	71
3.25.1	Invasions-Assay mit Antikörpern.....	71
3.25.2	Invasions-Assay mit rekombinantem Pf15N.....	72
3.26	Bindungs-Assay	72
3.27	Agglutinations-Assay mit Erythrocyten.....	73
3.27.1	Enzymbehandlung von Erythrocyten.....	73
3.27.2	Agglutinations-Assay.....	73
3.28	Kultivierung von HEK293.....	74
3.29	Transiente Transfektion von HEK293.....	74
3.30	Erythrocyten-Bindungs-Assay mit transfizierten HEK293-Zellen	76
4	Ergebnisse	77
4.1	Massenspektrometrische Identifikation der zu untersuchenden Proteine in Merozoiten	77
4.2	Zeitlicher Verlauf der Synthese der nativen Proteine in <i>P. falciparum</i>	81
4.3	Zelluläre Lokalisation	83
4.4	Viabilitäts-Assays.....	87
4.5	Invasions-Assays	87
4.5.1	Invasionsinhibition durch Antikörper.....	87
4.5.2	Invasionsinhibition mittels rekombinantem Pf15N	90
4.6	Bindungs-Assay mit Pf15N	93
4.7	Untersuchung der Agglutination von Erythrocyten durch Pf15N.....	95
4.7.1	Mikroskopische Untersuchung der Agglutination	95
4.7.2	Sequenzanalyse von Pf15N und den <i>Mock</i> -Peptiden	96
4.7.3	Agglutination von enzymbehandelten RBC	98
4.8	Erythrocyten-Bindungs-Assay mit transfizierten HEK293-Zellen	100

Inhaltsverzeichnis

5 Diskussion	104
Pf38	107
Pf117	108
Pf14	109
Pf15	111
6 Literaturverzeichnis.....	120
7 Zusammenfassung.....	138
8 Summary.....	140
Danksagung.....	142
Erklärung	143
Lebenslauf.....	144

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	1-dimensional, 2-dimensional
×g	Relative Zentrifugalkraft
°C	Grad Celsius
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
AMA-1	<i>Apical Membrane Antigen-1</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurereste
BCA	Bichinoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , Sammlung von Algorithmen für den Vergleich von Nuklein- und Aminosäuresequenzen
BNI	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CBB G-250	<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>
cDNA	komplementäre DNA
CV	<i>Column Volume</i> (Säulenvolumen)
Da	Dalton
DBGA	<i>Duffy Blood Group Antigen</i>
DBL	<i>Duffy Binding Like</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungsverzeichnis

7

EBL	<i>Erythrocyte Binding Like</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GRAVY	<i>Grand Average of Hydrophathy</i>
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HABP	<i>High Activity Binding Peptide</i>
hDHFR	humane Dihydrofolat-Reduktase
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
IAA	Iodacetamid
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
IgG	Immunglobulin G
iRBC	<i>Infected Red Blood Cell</i> (mit Parasit infizierter Erythrocyt)
kDa	Kilodalton
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> (Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke)
LB	Luria-Bertani
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation-Tandem Mass Spectrometry</i>
M	molar
mAB	monoklonaler Antikörper
mA	Milliampere
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry</i>

Abkürzungsverzeichnis

8

mAU	<i>Milli Absorbance Units</i> (Milli-Absorptionseinheiten)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> (multiple Klonierungsstelle)
MESH	<i>Merozoite Surface Sheddase</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MSP	<i>Merozoite Surface Protein</i>
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i> (Molekulare Ausschlussgröße in Da)
N	Normale Konzentration
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
nmol	Nanomol
OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Phosphatpuffer mit Salz)
PBST	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> + Tween20 (Phosphatpuffer mit Salz und Tween 20)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEMS	<i>Parasitophorous vacuolar Membrane Enclosed Merozoite Structure</i>
Pf15oSP	Pf15 ohne Signalpeptid
PFA	Paraformaldehyd
PfRh	<i>Plasmodium falciparum</i> RBL-Homologue

Abkürzungsverzeichnis

9

PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
ppm	<i>Parts Per Million</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
RBC	<i>Red Blood Cell</i> (Erythrocyt)
RBL	<i>Reticulocyte Binding Like</i>
red.	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SOC	<i>Salt-Optimized Broth + Carbon</i> (Salz-optimiertes Medium mit Glukose)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i> (Trispuffer mit Salz)
TBST	<i>Tris-Buffered Saline+Tween20</i> (Trispuffer mit Salz und Tween20)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
tRNA	Transfer-RNA
TVN	Tubovesikuläres Netzwerk
U	Units (Einheiten)
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UV	Ultraviolett
V	Volt
VT	Volumenteile
v/v	<i>Volume per Volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>Weight per Volume</i> (Gewicht pro Volumen)

1 Einleitung

1.1 Malaria

Malaria gehört neben Aids und Tuberkulose zu den wichtigsten Infektionskrankheiten weltweit. Sie ist in über 100 Ländern der tropischen und subtropischen Gebiete Afrikas, Asiens und Südamerikas endemisch (Abbildung 1). Ungefähr 40 % der Weltbevölkerung leben in diesen Gebieten und sind durch Malaria gefährdet. Jährlich infizieren sich bis zu 300 Mio. (2009: 225 Mio. gemeldete Fälle) Menschen. 2009 starben ca. 781000 Menschen an Malaria, 91 % davon in Afrika und 85 % Kinder unter 5 Jahren (WHO, 2010). Statistisch gesehen stirbt alle 30 Sekunden ein afrikanisches Kind an Malaria. In den meisten Endemiegebieten stellt die Krankheit jedoch nicht nur ein Gesundheitsrisiko dar, sondern ist auch Ursache für soziale und wirtschaftliche Probleme. Sie tritt vor allem in Entwicklungsländern auf, in denen sich die Bevölkerung eine adäquate Behandlung nicht leisten kann. Es wird geschätzt, dass Malaria ca. 40 % der Ausgaben des Gesundheitswesens Afrikas verursacht (WHO, 2010) und für bis zu 1,3 % Wachstums-Einbußen des Bruttoinlandproduktes von Afrika verantwortlich ist (Sachs und Malaney, 2002).

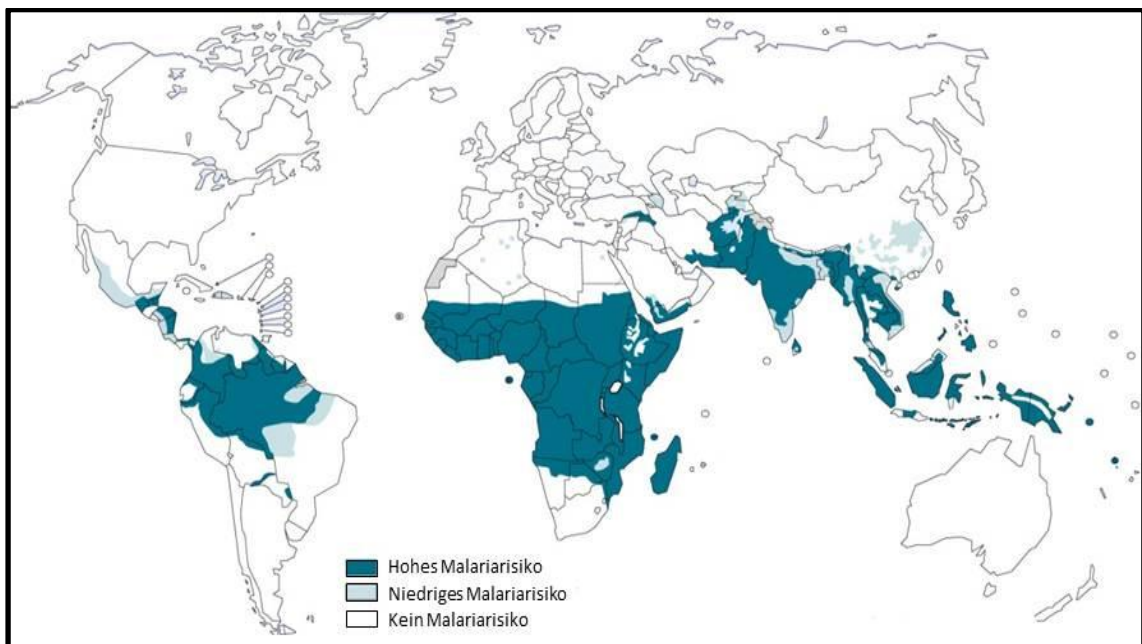


Abbildung 1: Geographische Verbreitung der Malaria. Malaria wird vor allem in den tropischen und subtropischen Gebieten Afrikas, Amerikas und Asiens übertragen. Abbildung nach WHO, 2010.

Die Erreger der Krankheit sind einzellige, obligate Parasiten der Gattung *Plasmodium*, die zum Stamm der Apicomplexa gehören. Es gibt fünf Arten humanpathogener Plasmodien, *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica), *Plasmodium ovale* (Malaria tertiana), *Plasmodium vivax* (Malaria tertiana), *Plasmodium malariae* (Malaria quartana) und neuere Studien zeigten, dass auch die ursprünglich in Affen beschriebene Art *Plasmodium knowlesi* humanpathogen ist (Cox-Singh und Singh, 2010, Sabbatani, 2010).

Befinden sich die Erreger in der erythrocytären Entwicklungsphase (siehe Abschnitt 1.2) treten die Symptome der Malaria-Erkrankung auf (Greenwood *et al.*, 2005). Dazu gehören regelmäßige Fieberschübe, Kopfschmerzen, Mattigkeit, Durchfall und Übelkeit (Hof und Dörris, 2009). Die Fieberschübe werden durch lösliche Malariatoxine ausgelöst, die bei der Freisetzung der Merozoiten aus den Erythrocyten freigesetzt werden. Die Toxine induzieren die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF α durch Makrophagen (Kwiatkowski, 1989, Taverne *et al.*, 1990). Durch den Abbau infizierter und nicht infizierter Erythrocyten in der Milz und durch eine verringerte Erythropoese kommt es außerdem zu einer Anämie (Weatherall und Abdallah, 1982, Phillips *et al.*, 1986). Die Malaria tropica, verursacht durch *P. falciparum*, unterscheidet sich durch unregelmäßig vorkommende Fieberschübe (alle 36-48 h) von den anderen zwei Krankheitsformen Malaria tertiana und quartana. Außerdem befinden sich auf der Oberfläche infizierter Erythrocyten Parasitenproteine, die eine Anheftung an das Kapillarendothel und eine sogenannte Rosettenbildung von infizierten und nicht infizierten Erythrocyten ermöglichen (Udeinya *et al.*, 1981, Helmby, 1993). Dadurch kommt es zu einer Verstopfung der Gefäße, die zu Komplikationen bis zu Multiorganversagen führen kann (Hof und Dörris, 2009). Kommt es während einer Malaria zu neurologischen Beschwerden, die bis ins Koma reichen können, dann wird von einer zerebralen Malaria gesprochen.

1.2 Lebenszyklus *Plasmodium*

Plasmodium falciparum ist ein obligater Endoparasit, der während seiner Entwicklung einen Generations- und Wirtswechsel durchläuft (Abbildung 2) (Hof und Dörris, 2009). *Plasmodium falciparum* wird durch den Stich der weiblichen Anopheles Mücken auf den Menschen übertragen. Die Sporozoiten werden mit dem Speichel der Mücke in das subkutane Gewebe oder in die Blutbahn injiziert und gelangen mit dem Blutstrom in die Leber (Ejigiri und Sinnis, 2009). Über die im Endothel sitzenden Lebermakrophagen (Kupfferzellen) dringen die Sporozoiten in das Lebergewebe ein und infizieren unter Ausbildung einer Parasitophoren Vakuole (PV) Hepatocyten (Vaughan *et al.*, 2008). In den

Hepatocyten vermehren sie sich asexuell zu mehreren tausend Merozoiten, die durch Merosomeschnürung in die Blutbahn gelangen und freigesetzt werden (Rankin *et al.*, 2010). Die Merozoiten invadieren in die Erythrocyten und entwickeln sich in der PV über das sogenannte Ringstadium zum Trophozoiten (Lingelbach und Joiner, 1998). Das Ringstadium erhielt seinen Namen aufgrund der typischen Siegelring-Struktur, die in Giemsa-gefärbten Blutausstrichen zu beobachten ist. Bereits in diesem Stadium beginnt der Export von Parasitenproteinen in das Wirtszellcytosol. Das Trophozoiten-Stadium (griech.: *trophain* = sich ernähren) weist einen sehr hohen Metabolismus auf. Bis zu 75 % des Hämoglobins wird als Nahrungsquelle genutzt und in einer Nahrungsvakuole abgebaut (Klemba *et al.*, 2004). Das Eisen der Hämgruppe wird in Form von Hämozoïn, auch bekannt als Malariapigment, gelagert. Der Trophozoit exportiert weiterhin Parasitenproteine und Lipide, die die sogenannten *Knobs*, *Maurer's Clefts* und das tubovesikuläre Netzwerk bilden (Deitsch und Wellems, 1996).

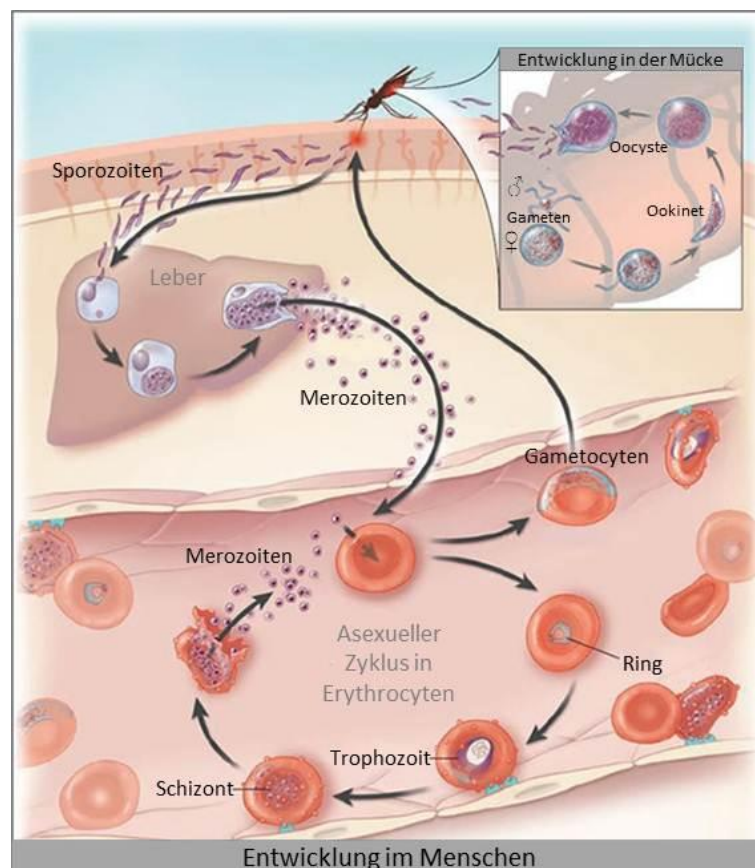


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*. Der Lebenszyklus von *P. falciparum* umfasst drei Phasen: Die ungeschlechtliche Vermehrung in den Hepatocyten der Leber (exoerythrocytäre Phase), in den Erythrocyten (erythrocytärer Zyklus) und die geschlechtliche Vermehrung (Gamogonie und Sporogonie) in der Mücke. Abbildung verändert von www.mcwhealthcare.

Im Schizonten-Stadium können durch Schizogonie bis zu 32 neue Merozoiten entstehen, die nach der Lyse der PV und der RBC-Plasmamembran freigesetzt werden und erneut in rote Blutkörperchen eindringen. Die Lyse der Erythrocyten und die Freisetzung der Merozoiten sind ursächlich für die Symptomatik der Malaria. Einige Merozoiten entwickeln sich in den Erythrocyten auch zu Geschlechtsformen, den männlichen Mikrogametocyten und den weiblichen Makrogametocyten. Diese werden während der Blutmahlzeit von der *Anopheles*-Mücke aufgenommen und beginnen die sexuelle Entwicklung im Mitteldarm der Mücke. Die Mikrogametocyten differenzieren sich zu Mikrogameten und die Makrogametocyten zu Makrogameten. Je ein Mikrogamet und ein Makrogamet verschmelzen zu diploiden, beweglichen Zygoten (Ookinete), die die Mitteldarmzellen durchqueren und sich zwischen Epithelschicht und Basalmembran der Mitteldarmwand zu Oocysten entwickeln. Durch asexuelle Vermehrung entstehen tausende haploide Sporozoiten, die aus der Oocyste freigesetzt werden und in die Speicheldrüsen der Mücken gelangen. Von hier aus werden die Sporozoiten wieder auf den Menschen übertragen.

1.3 Invasion der Merozoiten in die Erythrocyten

1.3.1 Die Merozoiten

Merozoiten sind invasive Stadien, die während der endohistocytären und erythrocytären Phase im Lebenszyklus des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* entstehen und sich strukturell und funktionell ähneln (Szarfman *et al.*, 1988a, b, Preiser *et al.*, 2002). Sie werden nach Vollendung der Schizogonie in den Blutkreislauf freigesetzt, um erneut in Erythrocyten einzudringen und sich zu vermehren. Ein Merozoit ist 1-2 μm lang und birnenförmig. Er besitzt neben den typisch eukaryontischen Organellen, wie den Zellkern, das Mitochondrion, die Ribosomen, das Endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat, noch den sogenannten Apicoplasten, der pflanzlichen Plastiden ähnelt (Abbildung 3) (Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001). Die Merozoiten besitzen zusätzlich eine besondere zelluläre Ausstattung, die mit der Invasion in Verbindung gebracht wird.

Die Merozoitenoberfläche erscheint in der elektronenmikroskopischen Aufnahme rau. Es handelt sich um eine Hülle aus membranverankerten Proteinen, die wahrscheinlich für die Erkennung und Bindung von geeigneten Wirtszellen zuständig sind (Langreth *et al.*, 1978, Bannister *et al.*, 1986, Galinski und Barnwell, 1996, Bannister und Mitchell, 2003). Die meisten bisher bekannten Proteine sind Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankerte und assoziierte Proteine (Sanders *et al.*, 2005). Die bekanntesten Proteine der Oberfläche

sind die sogenannten *Merozoite Surface Proteins* (MSP), darunter MSP-1, welches bisher am besten untersucht worden ist (siehe Abschnitt 1.3.2).

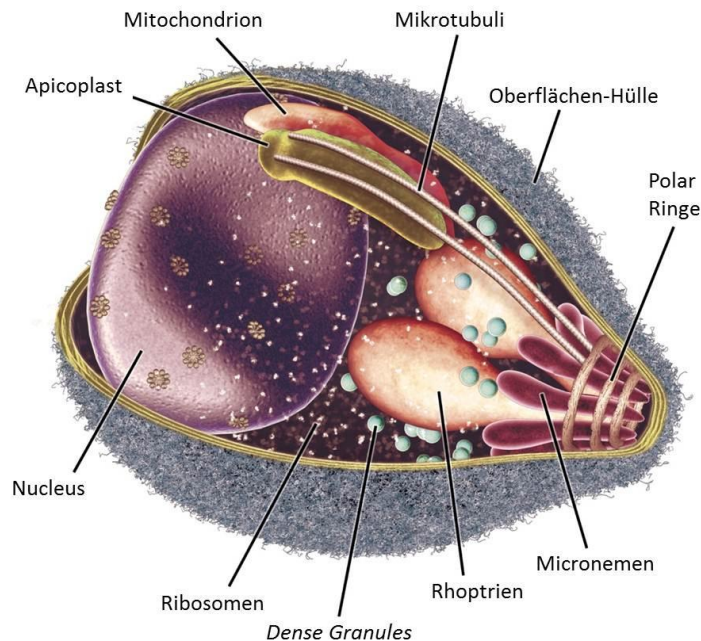


Abbildung 3: Darstellung eines Merozoiten und seiner Organellen. Die invasive Form des Malariaerregers ist 2 μm lang und enthält alle typisch eukaryontischen Organellen. Auf die Darstellung des Endoplasmatischen Reticulums und des Golgi-Apparates wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Am apikalen Pol befinden sich der Apikalkomplex bestehend aus paarigen Rhoptrien, Micronemen und *Dense Granules*. Abbildung nach Cowman und Crabb, 2006.

Der Apikalkomplex, der dem Phylum Apicomplexa seinen Namen gegeben hat, besteht aus den Micronemen, paarigen Rhoptrien und den sogenannten *Dense Granules* und ist am apikalen Pol des Merozoiten lokalisiert. Es handelt sich bei allen Bestandteilen um Organellen, die ihren Inhalt während der Invasion ausschütten und an den verschiedenen Schritten des Invasionsprozesses beteiligt sind (Bannister *et al.*, 2000). Die Rhoptrien und die Micronemen sind über einen Kanal mit der Merozoitenoberfläche verbunden und entlassen ihren Inhalt während der Invasion (Bannister *et al.*, 1986a, Sam-Yellowe *et al.*, 1988, Bannister und Mitchell, 1989). Die *Dense Granules* verschmelzen am Ende der Invasion mit der Plasmamembran und geben ebenfalls ihren Inhalt ab (Bannister *et al.*, 1975, Bannister und Mitchell, 1989, Torii *et al.*, 1989).

Das Cytoskelett der Merozoiten ist eher minimalistisch ausgestattet. Unter der Plasmamembran am apikalen Pol befinden sich die Polar Ringe, von denen ausgehend sich

nur zwei bis drei Mikrotubuli an einer der Zellseiten ausstrecken (Bannister *et al.*, 2000). Experimente mit Dinitroanilinen, die die Depolimerisation von Mikrotubuli bewirken, zeigten, dass diese an der Invasion beteiligt sind (Fowler *et al.*, 1998). Neben den Mikrotubuli finden sich auch Actin (F- und G-Actin) und mindestens vier Myosine in den Zellen. Es wird vermutet, dass ein Actin-Myosin-Motor zusammen mit weiteren Komponenten das sogenannte *Glideosom* bildet und den mechanischen Hauptantrieb für die Invasion darstellt (Keeley und Soldati, 2004).

1.3.2 Invasion von Erythrocyten

Im Lebenszyklus von *Plasmodium spp.* gibt es drei verschiedenen Stadien, die in Wirtszellen eindringen müssen: der Ookinet, der Sporozoit und der Merozoit. Die Invasion von Erythrocyten ist ein essentieller Schritt im Lebenszyklus des Parasiten, da nur die Merozoiten nach ihrer Freisetzung ins Blut extrazellulär der Immunabwehr des Vertebraten-Wirtes ausgeliefert sind (Cowman und Crabb, 2006, Iyer *et al.*, 2007). Deshalb muss der Invasionsprozess sehr schnell und effizient erfolgen. Es wird geschätzt, dass er innerhalb von ca. 30-60 Sekunden abgeschlossen ist (Dvorak *et al.*, 1975, O'Donnell und Blackman, 2005, Oh und Chishti, 2005). Die Invasion in die Erythrocyten ist sehr komplex und unterteilt sich in mehrere Phasen: die erste Anlagerung des Merozoiten, Reorientierung, um den apikalen Pol in den Kontakt mit der Wirtszelle zu bringen, Identifizierung der Wirtszelle, Bildung eines irreversiblen Zell-Zell-Kontaktes und schließlich die Invasion (Abbildung 4). Jeder Schritt ist abhängig von einer Kaskade verschiedenster molekularer Interaktionen. Obwohl bereits viele beteiligte Moleküle des Apikalkomplexes, der Parasiten- und Erythrocytenoberfläche identifiziert worden sind, bleiben ihre funktionellen Charakteristika meist unklar. Das Wissen, das bisher gewonnen wurde, stammt nicht nur aus Untersuchungen an *P. falciparum*, sondern auch von Experimenten mit anderen *Plasmodium*-Arten, wie z.B. *P. knowlesi* und *P. vivax*.

Anlagerung

Im ersten Schritt der Invasion lagert sich der Merozoit reversibel an die Erythrocytenmembran an (Bannister und Dluzewski, 1990). Dieser initiale Kontakt kann überall auf der Merozoitenoberfläche erfolgen (Cowman und Crabb, 2006). Diese Anlagerung scheint trotzdem wirtszellspezifisch zu sein, denn Experimente mit *P. knowlesi* zeigten, dass sich ihre Merozoiten nur an die Erythrocyten von Menschen und Rhesus-

Affen anlagerten, die beide zu den natürlichen vorkommenden Zwischenwirten gehören, aber nicht an die RBC von Meerschwein oder Huhn (Miller *et al.*, 1979).

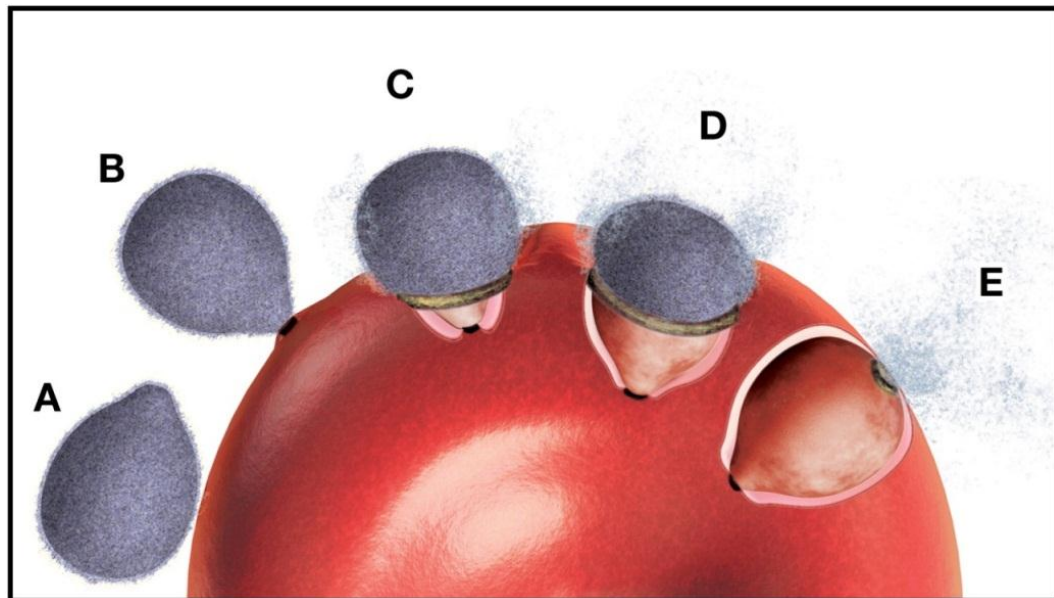


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Invasionsprozesses (Cowman und Crabb, 2006).

- A** Merozoitenanlagerung an die Erythrocyten-Oberfläche
- B** Reorientierung des apikalen Pols und Bildung der *Tight Junctions*
- C** Einstülpung der Erythrocyten-Plasmamembran, Ausbildung der *Moving Junctions*
- D** Aktiver Invasionsprozess unter Bildung der parasitophoren Vakuole und Abschneiden der Merozoitenoberflächenproteine
- E** Abschluss der Invasion durch Verschließen der parasitophoren Vakuole und des Erythrocyten

Es wurden bisher eine Reihe von Merozoitenoberflächenmolekülen identifiziert: MSP-1, 2, 4, 5, 8 und 10 sind über einen GPI-Anker in der Membran verankert (Gerold *et al.*, 1996, Marshall *et al.*, 1997 und 1998, Black *et al.*, 2001 und 2003), MSP-3, 6, 7 und 9 sind löslich und membranassoziiert (Stahl *et al.*, 1986, Weber *et al.*, 1988, McColl und Anders, 1997, Pachebat *et al.*, 2001, Trucco *et al.*, 2001, Vargas-Serrato *et al.*, 2002). Alle MSP sind strukturell sehr ähnlich. Außer MSP-2 haben alle ein oder zwei *Epidermal Growth Factor* (EGF)-ähnliche Domänen am C-Terminus, deren Funktionen während der Invasion aber bisher unbekannt sind (Gaur *et al.*, 2004).

MSP-1 ist das am besten untersuchte Protein der Merozoitenoberfläche. Es ist essentiell für das Überleben der Parasiten, denn es war bisher nicht möglich das Gen still zu legen (Gaur *et al.*, 2004). MSP-1 wird während der Schizogonie proteolytisch in vier Fragmente

(MSP-1_{83, 30, 38, 42}) gespalten, die auf der Merozoitenoberfläche gebunden bleiben (McBride und Heidrich, 1987, Holder *et al.*, 1992). MSP-1₄₂ ist über den GPI-Anker an die Plasmamembran gebunden (Gerold *et al.*, 1996) und wird während der Invasion ein zweites Mal proteolytisch gespalten (MSP-1₄₂ = MSP-1₁₉ + MSP-1₃₃). Das dabei entstehende MSP-1₁₉ Fragment enthält die EGF-Domäne, bleibt am Parasiten gebunden und ist nach der Invasion weiterhin nachweisbar (Blackman *et al.*, 1990 und 1991a, b). Durch Antikörper gegen MSP-1₁₉ wurde sowohl die Proteolyse von MSP-1₄₂ inhibiert (Blackman *et al.*, 1994) als auch die Invasion von Merozoiten in Erythrocyten *in vitro* blockiert. Die Immunisierung von Mäusen und *Aotus*-Affen mit rekombinanten MSP-1₄₂ und MSP-1₁₉-Proteinen führte zu einem Schutz gegen eine Infektion mit *Plasmodium* (Daly und Long, 1993, Ling *et al.*, 1994, Kumar *et al.*, 1995, Singh *et al.*, 2003). Für MSP-1 wurde außerdem gezeigt, dass der Ligand auf Seiten der Erythrocyten Bande-3 ist (Goel *et al.*, 2003). Auch MSP-9, das ein hochkonserviertes Antigen ist, bindet mit seiner C-terminalen Cystein-reichen Region in einem Coligandenkomplex mit MSP-1 ebenfalls an Bande-3 (Li *et al.*, 2004).

Reorientierung und Ausbildung einer *Tight Junction*

Während der Anlagerung der Merozoiten an die Erythrocyten ist der apikale Pol in der Regel nicht zur Wirtszelle hin ausgerichtet, so dass eine neue Positionierung des Parasiten stattfinden muss. Die molekularen Wechselwirkungen, die diesen Schritt ermöglichen, sind bisher kaum verstanden. Es wird jedoch vermutet, dass dabei ein Actin-Myosin Motor beteiligt ist (Morrissette und Sibley, 2002). Es wurde postuliert, dass das *Apical Membrane Antigen-1* (AMA-1) dabei eine wichtige Rolle spielt. Elektronenmikroskopisch wurde die Wirkung von invasionshemmenden Antikörpern gegen AMA-1 untersucht und festgestellt, dass die Merozoiten sich zwar an die Erythrocyten anlagerten, sich jedoch nicht reorientierten (Mitchell *et al.*, 2004). AMA-1 ist ein integrales Membranprotein vom Typ-I (Hodder *et al.*, 1996), das in den Micronemen lokalisiert ist (Healer *et al.*, 2002, Bannister *et al.*, 2003) Die extrazelluläre Domäne enthält 16 Cysteine, die unter allen *Plasmodium*-Arten hoch konserviert sind. Auch die cytoplasmatische Domäne ist konserviert, so dass eine Funktion bei der intrazellulären Signalweiterleitung oder bei der Ausbildung der *Moving Junctions* vermutet wird (Hodder *et al.*, 1996). Es war bisher nicht möglich eine *Knock-Out*-Mutante von AMA-1 zu generieren (Triglia *et al.*, 2000), aber Anti-AMA-1-Antikörper inhibieren die Invasion von *P. falciparum* und *P. knowlesi in vitro* (Deans *et al.*, 1982, Triglia *et al.*, 2000).

Während der initiale Kontakt zwischen Parasit und Wirtszelle reversibel ist, ist die Ausbildung der *Tight Junctions* ein irreversibler Schritt. Sobald der apikale Pol direkt zum Erythrocyten hin ausgerichtet ist, bildet sich eine direkte Verbindung zwischen dem invadierenden Merozoiten und der Wirtszellmembran. Es kommt zur Sezernierung des Inhalts der Micronemen. Elektronenmikroskopisch wird an der Kontaktstelle zwischen Parasit und Erythrocyt eine Verdickung der Erythrocytenmembran sichtbar, an die sich der apikale Pol des Merozoiten anheftet (Aikawa *et al.*, 1978). Schließlich kommt es zur Einbuchtung der Erythrocytenmembran und die *Tight Junction* bewegt sich um den invadierenden Merozoiten herum. Bisher wurden zwei Proteinfamilien identifiziert, die an der Bildung der *Tight Junctions* beteiligt sind: die *Erythrocyte Binding Like/Duffy Binding Like* (EBL/DBL)-Superfamilie und die *Reticulocyte Binding Like* (RBL)-Proteinfamilie (Iyer *et al.*, 2007). Entdeckt wurde die DBL-Familie, durch die Beobachtung, dass *P. knowlesi* nicht in *Duffy Blood Group Antigen* (DBGA)-negative RBC eindringen. Sie lagern sich zwar an und reorientieren sich, es kommt jedoch nicht zu einer Bildung der *Tight Junctions* (Miller *et al.*, 1979). *P. knowlesi* invadiert humane Erythrocyten also mit Hilfe des DBGA als Ligand auf der Wirtszelloberfläche (Miller *et al.*, 1975 und 1976, Barnwell, 1989), allerdings wurde eine direkte Beteiligung des DBGA an der Ausbildung der *Tight Junctions* nicht bewiesen. Die Mitglieder der EBL/DBL-Proteinfamilie sind charakterisiert durch zwei Cystein-reiche Regionen am N-Terminus, eine Transmembrandomäne und eine kurze cytoplasmatische Domäne. Obwohl *P. falciparum* alle humanen Erythrocyten befällt und nicht abhängig ist vom DBGA, wurden auch in ihm Proteine der DBL-Superfamilie identifiziert. Dazu gehören unter anderem EBA-175, BAEBL/EBA140, JESEBL/EBA-181 und EBL-1 (Camus und Hadley, 1985, Peterson *et al.*, 1995, Adams *et al.*, 2001, Gilberger *et al.*, 2003(JBC)). Die RBL-Superfamilie wurde mit Hilfe von *P. vivax* identifiziert, der nur in Reticulocyten eindringt, jedoch nicht in mature Erythrocyten. Es wurden zwei Proteine identifiziert (PvRBP-1, -2), die nur an Reticulocyten binden und nicht an Erythrocyten, so dass daraus geschlossen wurde, dass diese Proteine verantwortlich sind für die spezifische Invasion von Reticulocyten, allerdings ist der zugehörige Wirtszell-Ligand noch unbekannt (Galinski *et al.*, 1992). Es wurden auch hier RBL-homologe Proteine in *P. falciparum* (PfRh) identifiziert, dazu gehören PfRh-1, -2a und -2b, die am apikalen Pol von Merozoiten lokalisiert wurden (Rayner *et al.*, 2000 und 2001) und PfRh-4 (Kaneko *et al.*, 2002). Die Mitglieder der RBL-Familie sind in den Rhoptrien lokalisiert. Da *P. falciparum* nicht auf die Invasion von Reticulocyten spezialisiert ist, wird vermutet, dass diese Proteine weitere Funktionen während der Invasion übernehmen.

Invasion und *Moving Junction*

Nach der Ausbildung der *Tight Junctions* kommt es zur Invagination des Erythrocyten (Abbildung 5). Das Eindringen des Parasiten ist von einem Actin-Myosin-Motor angetrieben, was durch die Behandlung mit der Actin-hemmenden Substanz Cytochalasin B gezeigt wurde, die dazu führte, dass die Merozoiten nicht in die Wirtszellen eindringen (Miller *et al.*, 1979, Field *et al.*, 1993). Außerdem wurde PfMyo-1 in der Peripherie von Merozoiten, jedoch nicht am apikalen Pol nachgewiesen (Pinder *et al.*, 1998).

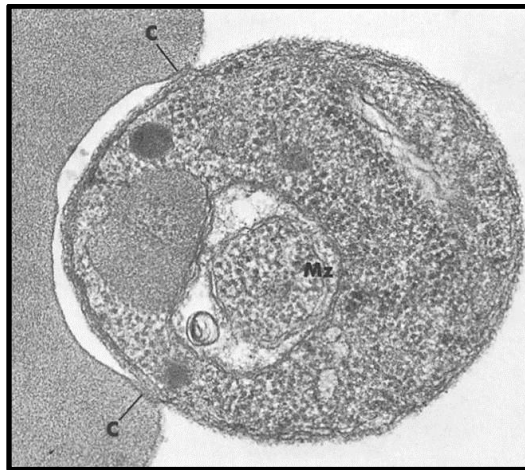


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines invadierenden *P. knowlesi* Merozoiten. Der Merozoit (Mz) ist bereits über Zellverbindungen (C) mit der Erythrocytenmembran verbunden und invaginiert sie. Abbildung aus Aikawa *et al.*, 1978.

Da sich die *Tight Junctions* während der Invasion entlang der Merozoitenoberfläche bewegen, werden sie auch als *Moving Junctions* bezeichnet (Aikawa *et al.*, 1978). Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob die *Moving Junctions* aus den *Tight Junctions* entstehen und die molekularen Komponenten identisch sind, oder ob *Tight* und *Moving Junctions* unabhängige Strukturen während der Invasion sind (Cortes, 2008). Die *Moving Junctions* bewegen sich vom apikalen Pol ausgehend ringförmig über die Oberfläche des Merozoiten. Hierbei werden gleichzeitig die Merozoiten-Oberflächenproteine durch die *Merozoite Surface Sheddase* (MESH) geschnitten (Howell *et al.*, 2003) oder durch die erst kürzlich in den Apicomplexa identifizierten Rhomboid-Proteasen, die innerhalb von Transmembrandomänen schneiden (O'Donnell und Blackman, 2005). Bei MESH handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um eine Subtilisin-ähnliche Protease, genannt SUB-2 (Harris *et al.*, 2005), die an den *Moving*

Junctions positioniert ist und so während der Invasion über die gesamte Merozoiten-Oberfläche gelenkt wird (O'Donnell und Blackman, 2005). Es kommt dabei zur Einstülpung der Erythrocyten-Plasmamembran, aus der die parasitophore Vakuole entsteht. Außerdem wird der Inhalt der Rhoptrien sezerniert. Hierzu gehören neben Lipiden, die vermutlich in die sich bildende parasitophore Vakuolenmembran (PVM) eingelagert werden, auch die Proteine der RBL-Familie. Des Weiteren wurden auch noch zwei Proteinkomplexe der Rhoptrien beschrieben: RhopH und RAP, jeweils bestehend aus mindestens drei Untereinheiten (Holder *et al.*, 1985, Cooper *et al.*, 1988). Einige Proteine des RhopH-Komplexes interagieren *in vitro* mit Lipiden der Erythrocytenmembran (Sam-Yellowe und Perkins, 1991) und sind nach der Invasion an der Parasiten-Plasmamembran und an der PVM zu finden. Der RAP-Komplex ist vermutlich an der Modifizierung der Parasiten-Plasmamembran oder dem Aufbau der PVM beteiligt. Am Ende des Invasionsprozesses löst sich am posterioren Ende des Merozoiten die PVM von der Erythrocytenmembran los, so dass zwei in sich geschlossene, voneinander getrennte Membransysteme entstehen. Als letztes fusionieren die *Dense Granules* mit der Parasiten-Plasmamembran und setzen ihren Inhalt frei, von dem angenommen wird, dass er an der Modifizierung der Wirtszelle beteiligt ist (Torii *et al.*, 1989, Culvenor *et al.*, 1991).

1.3.3 Alternative Invasionswege von *P. falciparum*

P. falciparum ist während seiner erythrocytären Entwicklung in der Lage auf verschiedenen Invasionswegen in die Wirtszellen einzudringen. Dies ist dem Parasiten wahrscheinlich in mehrfacher Hinsicht von Nutzen. Die meisten Erythrocytenbindungsproteine haben immunodominante Epitope, die eine Immunantwort auslösen. Die Verwendung unterschiedlicher Bindungspartner ermöglicht dem Parasiten eine erfolgreiche Invasion, obwohl gegen einige Moleküle bereits eine Immunantwort aufgebaut wurde (Gaur *et al.*, 2004). Des Weiteren erleichtern die unterschiedlichen Invasionswege wahrscheinlich den Befall von Erythrocyten jeden Alters und verschiedenster Bevölkerungsgruppen mit vielseitigen erythrocytären Protein-Polymorphismen und Unterschieden in der Oberflächenmolekül-Zusammensetzung (Cortes, 2008, Thompson *et al.*, 2001).

Die alternativen Invasionswege werden durch die beteiligten erythrocytären Bindungspartner klassifiziert. Die ersten Beweise für alternative Invasionswege wurden durch die Invasion von Glycophorin A- und Sialinsäure-defizienten RBC geliefert (Miller *et al.*, 1977, Pasvol *et al.*, 1982, Mitchell *et al.*, 1986). Invasionsstudien mit RBC, denen sowohl Glycophorin A als auch Glycophorin B fehlen, zeigten, dass es außerdem einen

Glycophorin A- und B-unabhängigen Invasionsweg gibt (Hadley *et al.*, 1987). Weitere Informationen über alternative Invasionswege wurden durch enzymatische Behandlung der Erythrocytenoberfläche gesammelt, allerdings ist diese Methode nicht dazu geeignet die Bindungspartner auf der Wirtszelloberfläche zu identifizieren, so dass die molekulare Identität der meisten Liganden bisher unbekannt bleibt (Tabelle 1).

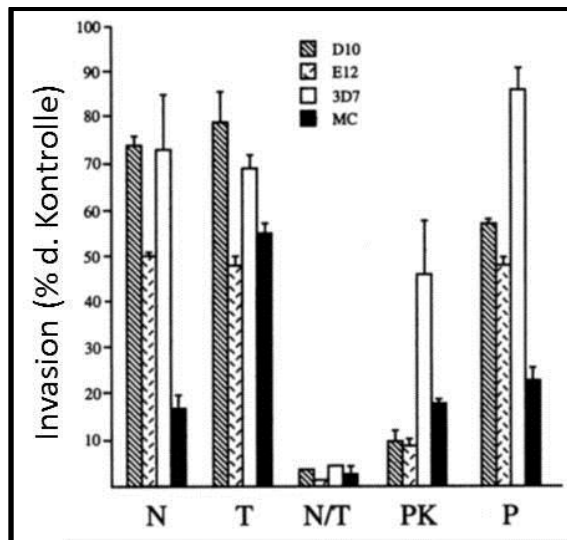


Abbildung 6: Invasion von *P. falciparum*-Merozoiten in enzymbehandelte Erythrocyten. Gereinigte Schizonten der Stämme D10, E12, 3D7 und *Malayan Camp* (MC) wurden mit Neuraminidase (N)-, Trypsin (T)-, Neuraminidase und Trypsin (N/T)-, Proteinase K (PK)- und Pronase (P)-behandelten RBC inkubiert. Nach der Invasion wurde die Parasitämie ausgezählt und in Relation zur Kontrolle gesetzt. Abbildung aus Thompson *et al.*, 2001.

Die meisten Stämme von *P. falciparum* sind in der Lage enzymbehandelte Erythrocyten zu invadieren (Abbildung 6) (Thompson *et al.*, 2001). Das Eindringen in Trypsin-behandelte RBC wird auf das Vorhandensein von Glycophorin B, ein Trypsin-resistentes Oberflächenmolekül, zurückgeführt (Dolan *et al.*, 1994, Gaur *et al.*, 2003). Der entsprechende Ligand von *Plasmodium* wurde noch nicht identifiziert. Es gibt allerdings auch Stämme, die in der Lage sind in Glycophorin B-defiziente (S-s-U) RBC, die zusätzlich mit Trypsin behandelt wurden, einzudringen (Gaur *et al.*, 2003). Sie benutzen also einen Glycophorin B-unabhängigen, Trypsin-resistenten Invasionsweg.

Invasionsstudien mit Neuraminidase-behandelten Erythrocyten zeigten, dass viele *P. falciparum* Stämme einen Sialinsäure-unabhängigen Invasionsweg verwenden (Thompson *et al.*, 2001). Lediglich die Stämme *Malayan Camp*, Dd2 und FCR3 drangen nur mit stark verminderter Invasionsrate in Neuraminidase-behandelte RBC ein. Sie verwenden einen

Tabelle 1: Zusammenstellung der alternativen Invasionswege *Plasmodium falciparum*. Die alternativen Invasionswege werden nach Sensitivität oder Resistenz gegenüber enzymatischer Behandlungen eingeteilt. Tabelle aus Gaur *et al.*, 2004.

Invasionsweg	Ligand (Parasit)	Ligand (RBC)
1. Sialinsäure-abhängig, Trypsin-sensitiv	EBA-175	Glycophorin A
	BAEBL (Dd2/Nm)	Glycophorin C
	JESEBL (PNG5)	Ligand unbekannt
2. Sialinsäure-abhängig, Trypsin-resistent	Ligand unbekannt	Glycophorin B
	JESEBL (Dd2/Nm)	Ligand unbekannt
	PfRH1	Ligand unbekannt („Y“)*
3. Sialinsäure-abhängig, Trypsin-, Proteinase K, Pronase-resistent	BAEBL (E12)	Ligand unbekannt
4. Sialinsäure-unabhängig, Trypsin-sensitiv	Ligand unbekannt	Ligand unbekannt („X“)*
	BAEBL (PNG4)	Ligand unbekannt
	JESEBL (HB3)	Ligand unbekannt
5. Sialinsäure-unabhängig, Trypsin-resistent	BAEBL (Mama)	Ligand unbekannt
	JESEBL (3D7)	Ligand unbekannt
	PfRh2b	Ligand unbekannt („Z“)*

* Bezeichnung in der Literatur

Neuraminidase-abhängigen Weg in die Wirtszelle (Mitchell *et al.*, 1986, Hadley *et al.*, 1987). Allerdings passte der Neuraminidase-sensitive Stamm Dd2 seinen Neuraminidase-abhängigen in einen Neuraminidase-unabhängigen Invasionsweg an, nachdem er über mehrere Zyklen in Neuraminidase-behandelten RBC kultiviert wurde (Dolan *et al.*, 1990). Das heißt, dass unterschiedliche Invasionswege in einem Parasiten koexistieren können. Wahrscheinlich ist also die Invasion nicht nur von einer speziellen Protein-Protein-Wechselwirkung abhängig, sondern von vielen variablen Bindungspartnern. Die bisher identifizierten Invasionswege sind abhängig von den Glycophorinen A, B, C/D und den Liganden X, Y, Z, deren Identität unbekannt ist, die

sich jedoch durch ihre Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber Trypsin und Neuraminidase definieren (Tabelle 1).

Erythrocyten präsentieren auf ihrer Zelloberfläche hauptsächlich Bande-3 und Glycophorin. Zusammen mit Spektrin machen sie ca. 60 % des Proteingewichts der Membranproteine aus (Alberts *et al.*, 2004). Außerdem sind auf der RBC-Oberfläche noch weitere Adhäsionsmoleküle zu finden (Tabelle 2), deren Funktion teilweise durch Studien in anderen Geweben charakterisiert wurde (Telen *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Adhäsionsmoleküle haben RBC die Fähigkeit an eine Reihe von Liganden zu binden, wie z.B. Thrombospondin, Fibronectin, Laminin, Hyaluron, Endothelzellen und Leukocyten.

Tabelle 2: Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Erythrocyten (verändert nach Telen, 2000).

Adhäsionsmolekül	Alternativer Name	Zusatzinformationen/Funktion
CD36*	<i>Platelet glycoprotein IV</i>	Schwach exprimiert in Reticulocyten
VLA-4*	$\alpha_4\beta_2$ -Integrin	Schwach exprimiert in Reticulocyten, Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte in Lymphocyten
CD44	<i>Hyaluronan receptor</i>	Ligand für Hyaluron und Fibronectin, Leukocyten Aggregation
CD47	<i>Integrin-associated protein</i>	Aggregation von Blutplättchen
CD58	<i>Lymphocyte-associated antigen-3</i>	Zell-Zell-Adhäsion über den Liganden CD2
CD99	<i>MIC2 gene product</i>	Involviert in Rosetten-Formation von T-Zellen
CDw108	-	RGD-Motif bekannt für Adhäsion
CD147	Neurothelin	Bindung von Endothelzellen und Fibroblasten
ICAM-4	Homolog zu intrazellulären ICAM 1-3	Teil des Rhesus-Komplexes
B-CAM/LU	<i>Laminin receptor (120)</i>	-
CDw75	Sialoglycan	Schwach exprimiert, B-Zell-B-Zell-Adhäsion durch Bindung an den Liganden CD22

1.3.4 Impfstoffentwicklung und natürlich auftretende Immunität

Die einzige Möglichkeit eine Infektion mit *Plasmodium spp.* zu verhindern besteht darin, sich vor Mückenstichen durch lange Kleidung, Bettnetze und Mücken-Abwehrmittel zu schützen und eine chemische Prophylaxe einzunehmen. Nach einer Infektion hilft nur eine medikamentöse Therapie. In den letzten Jahren führte die Verteilung von Insektizid-behandelten Bettnetzen und Artemisin-basierten Kombinationspräparaten zu einem Rückgang der Sterblichkeit an Malariainfektionen um bis zu 50 % (WHO, 2010). Allerdings erschweren zunehmende Resistenzen von *P.falciparum* gegen gängige Malaria-Medikamente und Insektizid-resistente *Anopheles*-Mücken die Malaria-Kontrolle (Dondorp *et al.*, 2010, N'Guessan, 2007). Die wahrscheinlich kostengünstigste und effektivste Methode der Malaria-Bekämpfung wäre eine wirksame Impfung. Die Entwicklung eines Malaria-Impfstoffes ist eines der Hauptziele der Malariaforschung. Um dieses zu erreichen, wird jedoch ein noch besseres Verständnis der schützenden Mechanismen der natürlich auftretenden Immunität in der Bevölkerung von Endemiegebieten und der Vakzinen-induzierten Immunität benötigt (O'Donnell *et al.*, 2001).

Ein von GlaxoSmithKline entwickelter Impfstoff richtet sich gegen die präerythrocytäre Phase im Menschen. Obwohl diese Phase im Menschen weder symptomatisch ist, noch bisher bekannt ist, dass in Endemie-Gebieten lebende Menschen eine effektive natürliche Immunität gegen diese Stadien entwickeln (Marsh und Kinyanjui, 2006), ist diese Vakzine die vielversprechendste von allen bisher in klinischen Studien getesteten Impfstoffen. In den 1960er Jahren wurde herausgefunden, dass durch Röntgenstrahlung attenuierte Sporozoiten vor einer Infektion mit Malaria schützen (Clyde *et al.*, 1973) und das Circumsporozoit-Protein (CSP), ein Sporozoiten-Oberflächen-Antigen, wurde als Zielstruktur für die Immunantwort identifiziert (Spitalny und Nussenzweig, 1973). Es wurde ein Impfstoff namens RTS,S/AS01 entwickelt (Ballou und Cahill, 2007), der bei Kindern im Alter zwischen 1 und 4 Jahren zu einer signifikanten Reduktion des Risikos sich zu infizieren und an schwerer Malaria zu erkranken um fast 50 % führte (Alonso *et al.*, 2005, Sacarlal, 2009). Phase II-Studien an Kindern wurden bereits abgeschlossen und Phase III-Studien wurden im Mai 2009 bereits begonnen (WHO, 2009). Allerdings besteht auch mit dieser vielversprechenden Vakzine kein hundertprozentiger Schutz vor Infektion, so dass für dieses Ziel wahrscheinlich eine Impfstoffkombination gegen mehrere Stadien des Parasiten benötigt wird (Cortes, 2008).

Eine der Schlüsselkomponenten der natürlichen Immunität gegen Blutstadien sind Antikörper (Crompton *et al.*, 2010). Dies zeigten vor allem Transfer-Studien, in denen Antikörper aus Malaria-immunen Erwachsenen aus Endemiegebieten verwendet wurden, um Patienten mit schwerer Malaria zu behandeln (Sabchareon *et al.*, 1991). Bisher konnten die Antikörper und die Wirkmechanismen, die zu einer natürlichen Immunität führen, nicht vollständig charakterisiert werden. Es ist jedoch bekannt, dass einige Antikörper, die *in vitro* gegen die erythrocytäre Entwicklung der Parasiten wirken, auch in semi-immunen Menschen aus Endemischen Gebieten gefunden wurden (O'Donnell *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass Antikörper gegen Merozoiten-Antigene dazu beitragen, dass sich die infizierten Erythrocyten nicht mehr an das Endothel anlagern, oder dass sie die Opsonisierung infizierter Zellen und Phagozytose durch Zellen des Immunsystems verursachen, oder dass sie die vom Parasiten freigesetzten proinflammatorischen Moleküle neutralisieren (Celada *et al.*, 1986, Baruch *et al.*, 1996, Schofield *et al.*, 2002, Fowkes *et al.*, 2010).

Wie bereits beschrieben ist der Invasionsprozess von Merozoiten ein komplexer Prozess, der eine Vielzahl an unterschiedlichen Wegen und Molekülen einschließt. Die Blockierung der Invasion unterbricht den erythrocytären Zyklus und ist deshalb einer der Mechanismen, auf die die Entwicklung von Vakzinen abzielt (Bates *et al.*, 2010). Einige Merozoiten-Oberflächenmoleküle werden bereits in klinischen Studien untersucht. Dazu gehören unter anderem: AMA-1, EBA-175, MSP-1, -2, -3. In Phase II-Studien von AMA-1 und MSP-1 wurde allerdings kein effektiver Schutz nachgewiesen (Sagara *et al.*, 2009, Ogutu *et al.*, 2009), so dass andere Merozoiten-Proteine für einen kombinierten Malaria-Impfstoff in Betracht gezogen werden müssen. Hierbei werden vor allem Parasitenproteine untersucht, die für die Erythrocyten-Invasion relevant sind. Es muss aber dabei berücksichtigt werden, dass aufgrund der alternativen Invasionswege mehrere Zielproteine benötigt werden, um die Invasion vollständig zu blockieren.

1.4 Identifizierung bisher unbekannter Merozoiten-Proteine aus *P. falciparum*

Die Grundlage dieser Arbeit sind die Ergebnisse des Dissertationsprojektes von J. Fritsch, das in der Zoophysiologie an der Universität Kiel 2007 abgeschlossen wurde. In seiner Doktorarbeit wurden mit Hilfe von drei Proteomanalysen von Membranpräparationen aus *PVM Enclosed Merozoite Structures* (PEMS) von *P. falciparum* 837 Proteine eindeutig identifiziert (Abbildung 7C, 8C, 9C, 11C). Diese 837 Proteine wurden nach besonderen projektbezogenen Kriterien durch *In-Silico*-Analyse selektiert, von denen vier in dieser Arbeit behandelt werden. Die verfügbaren Informationen und Ergebnisse aus Veröffentlichungen, PlasmoDB und der Dissertation von Dr. J. Fritsch sollen im folgenden Abschnitt dargestellt werden.

1.4.1 Pf14

Das Protein, das in der Arbeit J. Fritsch Pf13.8 benannt wurde, des Weiteren nur als Pf14 bezeichnet, hat die PlasmoDB-Identifikationsnummer PF10_0372 und wird durch 1062 bp auf Chromosom 10 des *P. falciparum*-Genoms codiert. Die codierende Sequenz beinhaltet drei Introns, die während der Transkription entfernt werden, so dass eine 363 b lange mRNA entsteht. Transkriptionsanalysen mit Microarrays zeigten, dass die Transkription von *Pf14* ca. 20 h nach Invasion ansteigt, bis sie ca. 20 h später ihr Maximum erreicht hat (PlasmoDB: Llinás *et al.*, 2006).

Das Protein Pf14 besteht aus 120 Aminosäuren, hat ein theoretisches Molekulargewicht von 13840 Da und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pI 10,16. SignalP berechnet mit Hilfe des Neuronalen Netzwerks (SignalP-NN) und des Hidden Markov Models (SignalP-HMM) Signalsequenzen (Emanuelsson *et al.*, 2007). Der Algorithmus des SignalP-NN sagt eine Signalpeptidase-Schnittstelle zwischen den Aminosäuren an Position 25 und 26 voraus. Gleichzeitig deuten die Berechnungen des SignalP-HMM darauf hin, dass es sich bei der Signalsequenz nicht um ein Signalpeptid, sondern um einen Signalanker handelt, der während der Translokation über die Membran nicht vom maturen Protein abgeschnitten wird. Außerdem wurden zwei Transmembrandomänen vorhergesagt, von denen sich eine teilweise mit der vorhergesagten Signalsequenz überschneidet (Abbildung 7).

Pf14 wird in der Literatur auch als Antigen UB05 beschrieben, das von den Antikörpern semi-immuner Erwachsener aus dem Regenwald Kameruns erkannt wurde. Deshalb wurde vermutet, dass anti-Pf14-IgG Bestandteil der natürlichen Immunität gegen Malaria sind (Titanji *et al.*, 2009).

Gegen Pf14 wurden Peptidantiseren in Kaninchen hergestellt, die in Immunofluoreszenz-Assays eine Lokalisation in der Merozoiten-Plasmamembran zeigten (Fritsch, 2007).

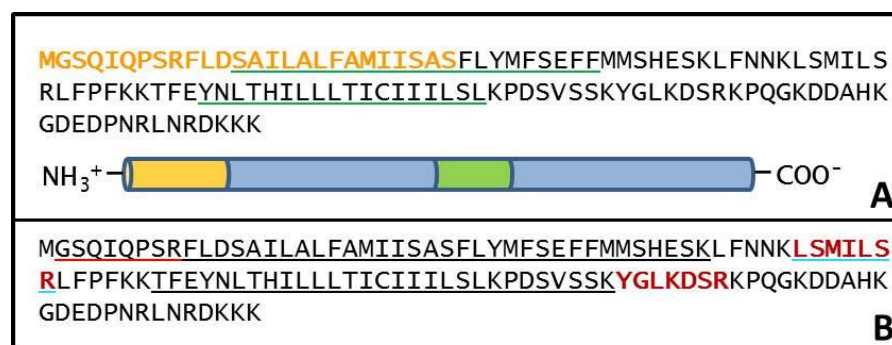


Abbildung 7: (A) Darstellung der Primärstruktur von Pf14 im Ein-Buchstabencode und schematisch. Vorhergesagte Signalsequenzen sind orange und vorhergesagte Transmembrandomänen sind grün hervorgehoben. **(B) Massenspektrometrisch identifizierte Sequenzen.** Die in der Arbeit von J. Fritsch identifizierten Fragmente aus PEMS-Membranpräparationen sind rot dargestellt und die durch die Leiden Malaria Group (vorabpubliziert bei PlasmoDB) identifizierten Sequenzen aus Merozoiten sind rot unterstrichen, aus Trophozoiten schwarz unterstrichen und in beiden Stadien identifizierte Peptide sind blau unterstrichen.

1.4.2 Pf15

Das Protein, das in der Doktorarbeit von J. Fritsch Pf15.2 benannt wurde, des Weiteren nur als Pf15 bezeichnet, hat die PlasmoDB-Identifikationsnummer PF11_0179 und wird durch 387 bp ohne Introns auf Chromosom 11 des *P. falciparum*-Genoms codiert. Transkriptionsanalysen mit Microarrays zeigten, dass die Transkription von *Pf15* ca. 25 h nach Invasion ansteigt, bis sie ca. 30 h später ihr Maximum erreicht hat (PlasmoDB: Llinás *et al.*, 2006).

Das Protein Pf15 besteht aus 128 Aminosäuren, hat ein theoretisches Molekulargewicht von 15263 Da und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pI 10,16. Für Pf15 wurde von SignalP-NN eine Signalpeptidase-Schnittstelle hinter der 18. Aminosäure vorhergesagt.

Die Vorhersage von SignalP-HMM sagt hingegen ein vier Aminosäuren längere Signalsequenz voraus, bei der jedoch unklar ist ob es sich um ein Signalpeptid oder einen Signalanker handelt. Außerdem wurden drei Transmembrandomänen vorhergesagt, von denen sich eine teilweise mit der vorhergesagten Signalsequenz überschneidet und die anderen beiden durch nur 3 Aminosäuren voneinander getrennt sind (Abbildung 8). Gegen Pf15 wurden Peptidantiseren in Kaninchen hergestellt, die in Immunofluoreszenz-Assays eine Lokalisation in der Merozoiten-Plasmamembran zeigten (Fritsch, 2007).

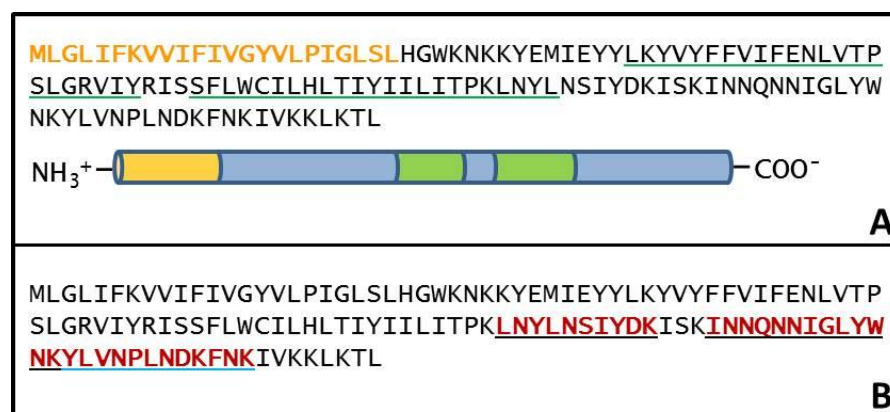


Abbildung 8: (A) Darstellung der Primärstruktur von Pf15 im Ein-Buchstabencode und schematisch. Vorhergesagte Signalsequenzen sind **orange** und vorhergesagte Transmembrandomänen sind **grün** hervorgehoben. **(B) Massenspektrometrisch identifizierte Sequenzen.** Die in der Arbeit von J. Fritsch identifizierten Fragmente aus PEMS-Membranpräparationen sind in **rot** dargestellt und die durch die Leiden Malaria Group (vorabpubliziert bei PlasmoDB) identifizierten Sequenzen aus Trophozoiten sind schwarz unterstrichen und die zusätzlich in Merozoiten identifizierten Peptide sind blau unterstrichen.

1.4.3 Pf38

Das Protein Pf38 hat die PlasmoDB-Identifikationsnummer PF11_0179 und wird durch 1050 bp ohne Introns auf Chromosom 5 des *P. falciparum*-Genoms codiert. Transkriptionsanalysen mit Microarrays zeigten, dass die Transkription von *Pf15* ca. 18 h nach Invasion ansteigt, bis sie 45 h nach Invasion ihr Maximum erreicht hat (PlasmoDB: Bozdech *et al.*, 2003).

Das Protein Pf38 besteht aus 349 Aminosäuren, hat ein theoretisches Molekulargewicht von 40588 Da und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pI 7,57. Beide Algorithmen von SignalP sagen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine

Signalpeptidase-Schnittstelle hinter der 21. Aminosäure voraus. Des Weiteren wurden für Pf38 ein C-terminaler GPI-Anker vorhergesagt (Gilson *et al.*, 2006) und eine Transmembrandomäne am C-Terminus (Abbildung 9). Sanders *et al.* lokalisierten GFP-Pf38-Fusionsproteine am apikalen Pol (Sanders *et al.*, 2005). Garcia *et al.* testeten synthetische Peptide mit einer Länge von 20 AS, die die gesamte Sequenz von Pf38 abdeckten, auf ihre Bindungsfähigkeit an Erythrocyten. Es wurden zwei sogenannte *High Affinity Binding Peptides* (HABP) identifiziert (Abbildung 10), die in Invasions-Assays die Invasion um 33 (Peptid 33645, 200 μ M) bzw. 20 % (Peptid 33648, 200 μ M) inhibierten (Garcia *et al.*, 2009). Das rekombinant hergestellte Orthologe aus *P. vivax*, Pv38, wurde im ELISA mit Hilfe von Seren aus *P. vivax* infizierten Aotus-Affen nachgewiesen. Das heißt, dass *in vivo* Antikörper gegen Pv38 von den Affen gebildet wurden (Mongui *et al.*, 2008). Gegen Pf38 wurden Peptidantiseren in Kaninchen hergestellt, die in Immunofluoreszenz-Assays eine Lokalisation in Rhoptrien von Merozoiten zeigten (Fritsch, 2007).

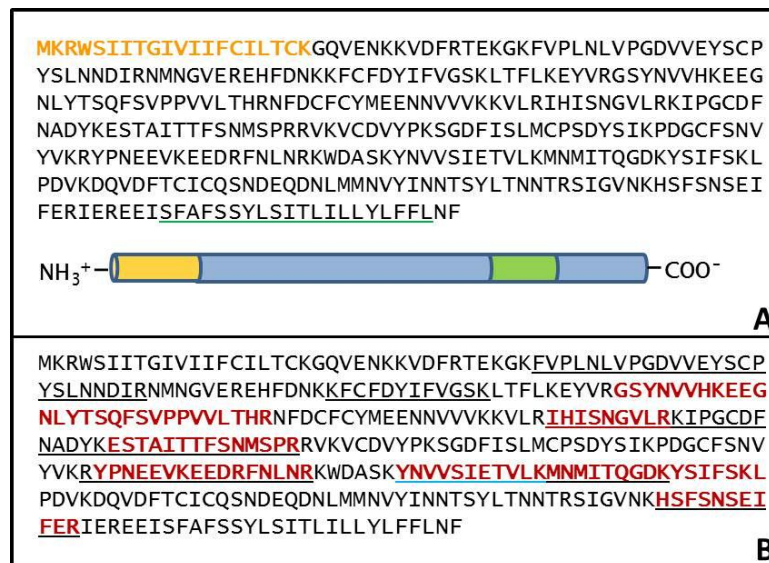


Abbildung 9: (A) Darstellung der Primärstruktur von Pf38 im Ein-Buchstabencode und schematisch. Vorhergesagte Signalsequenzen sind orange und vorhergesagte Transmembrandomänen sind grün hervorgehoben. (B) Massenspektrometrisch identifizierte Sequenzen. Die in der Arbeit von J. Fritsch identifizierten Fragmente aus PEMS-Membranpräparationen sind in rot dargestellt und die durch die Leiden Malaria Group (vorabpubliziert bei PlasmoDB) identifizierten Sequenzen aus Trophozoiten sind schwarz unterstrichen und die zusätzlich in Merozoiten identifizierten Peptide sind blau unterstrichen.

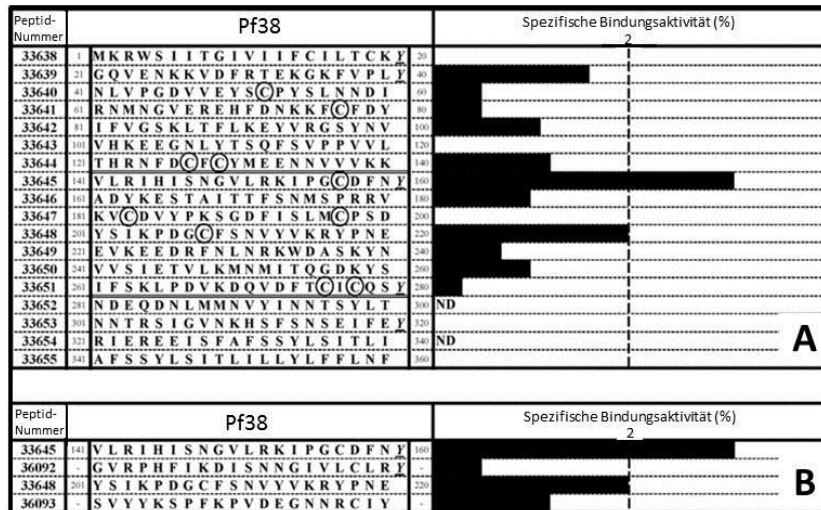


Abbildung 10: Identifikation von Pf38-HABP. (A) Bindungsaktivität der synthetischen Pf38-Peptide. Die Peptide 33645 und 33648 zeigten die höchste Bindungsaktivität. (B) Bindungsprofile der beiden Pf38-HABP 33645 und 33648 und ihrer Mock-Peptide. Die Mock-Peptide zeigten eine niedrigere Bindungsaktivität als die zugehörigen HABP. Die schwarzen horizontalen Balken repräsentieren die Bindungsaktivität des zugehörigen Peptides. Abbildung aus Garcia *et al.*, 2009.

1.4.4 Pf117

Das Protein, das in der Arbeit Pf117.4 benannt wurde, des Weiteren nur als Pf117 bezeichnet, hat die PlasmoDB-Identifikationsnummer PFL1415w und wird durch 2973 bp ohne Introns auf Chromosom 12 des *P. falciparum*-Genoms codiert. Transkriptionsanalysen mit Oligonukleotid-Arrays zeigten, dass die Transkription von *Pf117* ab dem späten Trophozoiten-Stadium ansteigt und im späten Schizontenstadium sein Maximum erreicht (Le Roch *et al.*, 2003).

Das Protein Pf117 besteht aus 990 Aminosäuren, hat ein theoretisches Molekulargewicht von 117483 Da und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pI 5,73. Beide Algorithmen von SignalP sagen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Signalpeptidase-Schnittstelle hinter der 19. Aminosäure voraus (Abbildung 11).

Gegen Pf117 wurden Peptidantiseren in Kaninchen hergestellt, die in Immunofluoreszenz-Assays eine Lokalisation in der Merozoiten-Plasmamembran zeigten (Fritsch, 2007).

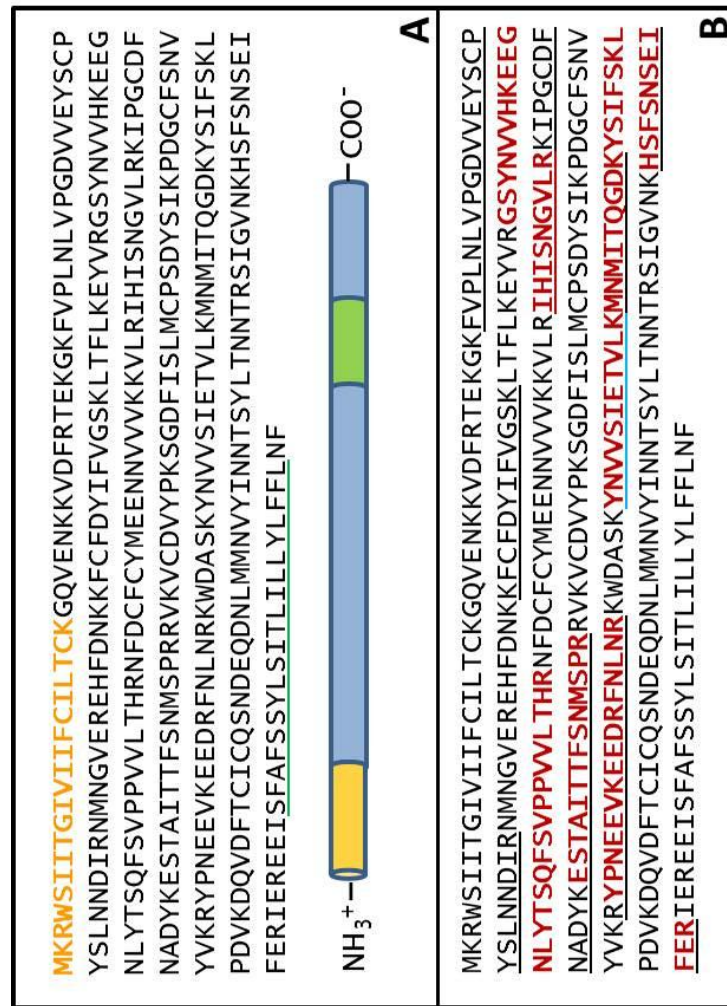


Abbildung 11: (A) Darstellung der Primärstruktur von Pf17 im Ein-Buchstabencode und schematisch. Vorhergesagte Signalsequenzen sind orange und vorhergesagte Transmembrandomänen sind grün hervorgehoben. (B) Massenspektrometrisch identifizierte Sequenzen. Die in der Arbeit von J. Fritsch identifizierten Fragmente aus PEMS-Membranpräparationen sind in rot dargestellt und die durch die Leiden Malaria Group (vorabpubliziert bei PlasmoDB) identifizierten Sequenzen aus Merozoiten sind rot unterstrichen, aus Trophozoiten schwarz unterstrichen und in beiden Stadien identifizierte Peptide sind blau unterstrichen.

1.5 Zielsetzung

Malaria-Parasiten müssen während ihres Lebenszyklus spezifisch geeignete Wirtszellen erkennen und in sie eindringen. Die Invasion von Erythrocyten durch *Plasmodium* ist ein obligatorischer und parasiten-spezifischer Prozess und die Effizienz mit der Merozoiten in die Erythrocyten eindringen ist eine wichtige Pathogenitätseigenschaft, die direkten Einfluss auf den Verlauf und die Symptomatik der Krankheit hat. Die Invasion ist äußerst komplex und abhängig von einer Reihe von Molekülen und Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Parasiten- und Wirtszelle, die auf molekularer Ebene noch nicht vollständig identifiziert und charakterisiert wurden. Erschwerend kommen die sogenannten alternativen Invasionswege hinzu, die die Anzahl an möglichen Interaktionspartnern und Proteinkomplexen vervielfachen.

Im Rahmen einer 2007 abgeschlossenen Dissertation von J. Fritsch wurden ausgehend von einem auf *Proteomics* basierenden experimentellen Ansatz vier bisher unbekannt Proteine identifiziert, die auf zellulärer Ebene in der Plasmamembran und den Rhoptrien von Merozoiten nachgewiesen wurden.

Ziel dieser Arbeit war, die vier Proteine funktionell zu untersuchen. Da die zu untersuchenden Proteine bisher nur im Rahmen einer Analyse der Membranstrukturen intraerythrocytärer Stadien identifiziert wurden, die primär auf die Identifikation von Proteinen der PVM und des TVN abzielte, sollte die Identifikation in Membranen isolierter extrazellulärer Merozoiten durchgeführt und bestätigt werden. Zudem sollte die Lokalisation der Proteine sowohl mit immunfluoreszenzmikroskopischen Methoden als auch mit Hilfe von transgenen Parasiten, die die Zielproteine als GFP-Reportergeräten-Konstrukte exprimieren sollten, reproduziert und vor allem bestätigt werden. Die Entwicklung der Parasiten in den Erythrocyten ist exakt reguliert, so dass eine Analyse der stadienspezifischen Synthese der zu untersuchenden Proteine Hinweise auf ihren Funktionsbereich geben sollte. Es sollte der Einfluss proteinspezifischer Antikörper auf den intraerythrocytären Zyklus und die Invasion der Merozoiten in die Wirtszellen untersucht werden. Bindungsstudien mit rekombinant hergestellten Peptiden und die funktionellen Analysen sollten zum grundlegenden Verständnis der molekularen Mechanismen des asexuellen Zyklus, insbesondere die invasiven Stadien betreffend, beitragen und eine Beurteilung der Zielproteine als potentielle Kandidaten für die Impfstoffentwicklung ermöglichen.

2 Material

2.1 Chemikalien

5-Brom-4-Chlor-Indoxylphosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Acetonitril (ACN)	Roth
Acrylamidlösungen	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
AlbuMAXII	Invitrogen
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin Natriumsalz	Applichem, Darmstadt
B orsäure	Applichem
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Applichem
C alciumchlorid (CaCl ₂)	Applichem
Chloroform	Applichem
<i>Coomassie-Brillant-Blue</i> G250 (CBB G-250)	Applichem
D iethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth
Dimethylformamid (DMF)	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Roth
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
D-Sorbitol	Sigma

EDTA , di-Natriumsalz	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol ($\geq 99,8$ %p.a.)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehyd	Applichem
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Gentamycinsulfat	Roth
Gelafundin	B. Braun, Melsungen
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
Glukose	Roth
Glutardialdehyd	Sigma
Glycerin (≥ 86 % p.a.)	Roth
Glycin	Merck
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Roth
Hoechst 33258	Sigma
HPLC-Wasser	Roth
Iodacetamid (IAA)	Calbiochem, Schwalbach
Isopropanol	Roth
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumacetat	Applichem
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth
Mangandichlorid (MnCl_2)	
Methanol (MeOH)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Applichem
MobiGLOW <i>Mounting Medium</i>	Mo Bi Tec, Göttingen
<i>my-Budget RNAmagic</i>	Bio-Budget Technologies, Krefeld

Natriumacetat	Roth
Natriumazid (NaN_3)	Applichem
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	MP Biomedicals
Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Roth
Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Roth
Natronlauge (NaOH)	Merck, Roth
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roth
Paraformaldehyd	Applichem
Percoll	GE Healthcare, München
Phosphorsäure <i>Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Complete EDTA-free</i> (PIC)	Roche
RPMI 1640, mit 25 mM HEPES	Gibco
RPMI 1640, ohne Phenolrot	Gibco
Salzsäure (HCl), 37 % (w/v)	Roth
Saponin (aus Gypsophila)	Sigma
Silbernitrat (AgNO_3)	Sigma
Silikonöl AR200, $\rho = 1,038$	Wacker Chemie, München
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Trifluoressigsäure (TFA)	Applichem
Tris	Roth
Tricin	Roth
Triton X-100	Applichem
Trypton (Pepton aus Casein, tryptisch geschnitten)	Roth
TurboFect™	Fermentas
Tween 20	Applichem

WR99210	Jacobus Pharmaceutical Company, USA
Zitronensäure (Citrat)	Roth

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 mit Apotom	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Axioskop 40	Zeiss
<i>Software</i> Axiovision Rel 4.5	
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus	Zeiss
<i>Software</i> Openlab 5	

Zentrifugen und Rotoren

<i>Airfuge</i> TM , <i>Air Driven Ultracentrifuge</i> AB901	Beckmann, Krefeld
<i>Centrifuge</i> 5417 R/ F45-30-11	Eppendorf, Hamburg
Centrikon H-401/ A8.24	Kontron, München
<i>Minifuge</i> RF/ 3360	Heraeus, Hanau
<i>Minispin</i>	Eppendorf
Rotanta 460 R	Hettich, Tuttlingen
Sorvall® RC-5B/ A6.14	Du Pont, Bad Homburg
Ultrazentrifuge L7-65/ 70 Ti	Beckmann
Vakuum-Zentrifuge <i>SpeedVac</i> UVS400A/ RH40.12, RH2MP	Thermo Fisher Scientific

Sonstige Geräte

<i>AKTA</i> TM <i>purifier</i> 10	GE Healthcare, München
<i>Blotting</i> -Apparaturen:	
<i>PerfectBlue</i> TM <i>Semi Dry Electrobloetter</i>	Peqlab, Erlangen
<i>Semi Dry Blotting</i> -Apparatur	PHASE, Lübeck
<i>PerfectBlue</i> TM <i>Tank-Elektrobloetter Web M</i>	Peqlab
Easyject Prima Elektroporator	Equibio, Willstätt

Elektrophoresezubehör:

Agarose-Gelkammern:

Modell-Nr: 40-1214 und 40-0708 Peqlab

PAGE-Gelkammern:

Modell-Nr.: 45-1010-i und 45-1614-i Peqlab

Spannungsgeber E835 und E861 Consort

Transilluminator PHASE, Lübeck

Tecan Genios Tecan, Schweiz

Gefriertrocknungs-Anlage Alpha 2-4 LSC Christ, Osterode/Harz

Inkubatoren

CB 150 Binder, Tuttlingen

BB6220 und BB6060 Heraeus

MALDI-TOF-TOF-MS: 4700 *Proteomics Analyzer* Applied Biosystems, USA

Multiskan® MCC/340 Titertek, USA

Nano Drop ND-1000 Thermo Fisher Scientific

Peristaltikpumpe LKB Pump P-1 Pharmacia

Photometer Ultraspec 1100 pro Amersham Biosciences

Reinstwasseranlage GenPure TKA, Niederelbert

Sonotrode MS73 Sonopuls Bandelin HD 2070

Thermocycler, Mastercycler EPGradient Eppendorf

Thermomixer Comfort Eppendorf

Ultraschallbad Sonorex Super RK 106 Bandelin Sonorex

Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikmaterialien wurden, soweit nicht anders beschrieben von der Firma Sarstedt bezogen.

Frischhaltebox, 100 % luftdicht EMSA, Emsdetten

Vivaspin 2-Konzentratoren Millipore, Schwalbach

2.3 Allgemeine Pufferlösungen und Medien

LB-Medium	1 %(w/v) NaCl 1 %(w/v) Trypton 0,5 %(w/v) Hefeextrakt
LB-Agar-Platten	LB-Medium mit 1,5 %(w/v) Agar-Agar
LB_{Amp}-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
PBS, pH7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 12,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄
TBS, pH7,4	20 mM Tris 150 mM NaCl

2.4 Größenstandards für die Elektrophorese

GeneRuler™ DNA Ladder Mix 100 – 10000 bp	Fermentas
<i>SeeBlue Plus2 prestained standard</i>	Invitrogen

2.5 Enzyme

<i>Fast Digest</i> Restriktionsenzyme	Fermentas
<i>SuperScriptIII RNase H-Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen
Pwo	
Taq DNA Polymerase	Fermentas
T4 DNA-Ligase	Fermentas
Neuraminidase	Sigma
Pronase	Fluka
Proteinase K	
Thrombin	GE Healthcare
Trypsin	Sigma

2.6 Vektoren

pGEX-2T	GE Healthcare
pcDNA3.1-mTACE-GFP	Dr. J. Scheller, Biochemisches Institut, CAU Kiel
pcDNA3.1-IL6R-GFP	Dr. J. Scheller, Biochemisches Institut, CAU Kiel

2.7 Kits

MicroBCA™ <i>Protein Assay Kit</i>	Pierce
Nucleospin® <i>Plasmid Quick Pure</i>	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin® <i>ExtractIII</i>	Macherey-Nagel
peqGOLD <i>Gel Extraction Kit</i>	Peqlab

2.8 Synthetische Peptide

Es wurden folgende Peptide von der Firma Biosyntan, Berlin hergestellt. Es handelte sich dabei um *Mock*-Peptide, deren Aminosäurezusammensetzung identisch war zu Pf15N (siehe Abschnitt 3.17), die Abfolge jedoch zufällig.

Mock-8: YEKGIKYMHYWKGSN

Mock-9: IGHYKENWYEKGYSMK

2.9 Antikörper und Immunisierungspeptide

Maus-anti-Bande-3-Antikörper, monoklonal	Sigma
Kaninchen-anti-Pf14-Antiserum (SABT5066/67)	Eurogentec, Köln
Kaninchen-anti-Pf15- Antiserum (SABT5052/53)	Eurogentec
Kaninchen-anti-Pf38- Antiserum (SABT5062/63)	Eurogentec
Kaninchen-anti-Pf117- Antiserum (SABT5060/61)	Eurogentec
Ziege-anti-Maus IgG-DyLight488	Jackson Immuno Research, England
Ziege-anti-Kaninchen IgG-DyLight549	Jackson Immuno Research

Tabelle 3: Bezeichnungen, Sequenzen und Position der für die Kaninchen-Antiseren verwendeten Immunisierungspeptide. Die Immunisierungspeptid (IP)-Nummern entsprechen der Bezeichnung durch die Firma Eurogentec. Zur Vereinfachung wurde die Position in der schematischen Darstellung der Proteine nur durch die letzten zwei Ziffern der IP-Nummern markiert.

IP-Nummer	IP-Sequenz	Antiserum
EP053668	CKPQGKDDAHKGDEDP	Kaninchen-anti-Pf14
EP053669	CKPDSVSSKYGLKDSR	
EP053623	ISKINNQNNIGLYC	Kaninchen-anti-Pf15
EP053624	CHGWKNKKYEMIE	
EP053621	CEDRFNLRKWDASKY	Kaninchen-anti-Pf38
EP053622	VENKKVDFRTEKGKF	
EP053617	CKDIPKEGSADEYSQD	Kaninchen-anti-Pf117
EP053618	CHLAKGDSKKDEMKE	

2.10 Primer

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete *Primer*. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

<i>Primer-Name</i>	<i>Primer-Sequenz</i>
Oligo Dt-17I-Primer	5`- GAGAGAGGATCCAAGTACTAATACGACTCACTATA GGGAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT _v -`3
pGEX5`	5`-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-`3
pGEX3`	5`-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-`3
PfSerylRNASynthF1	5`-AAGTAGCAGGTCATCGTGGTT-`3
PfSerylRNASynthR1	5`-TTCGGCACATTCCTCCATAA-`3
Pf15.2aF1	5`- <u>GGATCCC</u> CACGGATGGAAAAATA -`3
Pf15.2aR1	5`- <u>GAATTC</u> TTAATAATATCAATCATCTC -`3
Pf13.8-kpn1-s	5`-GCGCGGT <u>ACCAT</u> GGGGTCACAAATCAACCATCAA G-`3
Pf13.8-avr2-as	5`-GCGACCT <u>AGG</u> TTTTTCTTGTCACGATTTAATCTAT TTGG-`3
Pf15.2-kpn1-s	5`-GCGCGGT <u>ACCAT</u> GTTGGGTTTAATATTTAAAGTAG -`3
Pf15.2-avr2-as	5`-GCGACCT <u>AGG</u> TAATGTCITTAATTTCTTTACAATTT TG-`3
Pf38-kpn1-s	5`-GCGCGGT <u>ACCAT</u> GAAACGCTGGTCAATCATTACAG G-`3
Pf38-6×G-avr2-as	5`-GCGACCT <u>AGG</u> TCCTCCTCCTCCTCCTCCAAAGTTTA AAAAGAAAAGATATAAAAAG-`3
Pf117.4-xma1-s	5`-GCGACCCGGGATGGTACCATGAAGTTGAAATATCA TTTATTTTTTC-`3
Pf117.4-avr2-as	5`-GCGACCT <u>AGG</u> TGCCATGTCAAGTGAATTTTCTTGA AACG-`3
Pf15_KpnI-F1	5`-GAGAG <u>G</u> TACCATGTTGGGTTTAATATTTAAAGTAG -`3
Pf15_BlpI_F1	5`-GAGAGCTTAGCCACGGATGGAAAAATA -`3
Pf15_BamHI_R2	5`-GAGAGGATCCAGTAATGTCITTAATTTCTTTACAAT TTTG -`3
pcDNA3.1-IL6R-PfIMI-F1	5`- <u>ACCATGGAGTGGT</u> AGCCGAGGAGG-`3
pcDNA3.1-IL6R-BlpI-R2	5`- <u>GCTTAGC</u> GGCGCCGCTCCCGGCGCG-`3

3 Methoden

3.1 Führung einer *Plasmodium falciparum*-Kultur

3.1.1 *Plasmodium falciparum*-Stämme und Erythrocyten

FCBR	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. K. Lingelbach, Marburg
3D7	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R.D. Walter, BNI, Hamburg
Humane Erythrocyten,	bezogen vom Institut für Transfusionsmedizin des Blutgruppe A, Rhesus positiv
	UKSH Kiel

3.1.2 *In-Vitro*-Kultivierung von *Plasmodium falciparum* FCBR

Die erythrocytären Stadien von *P.falciparum* wurden unter sterilen Bedingungen verändert nach den Methoden von Trager und Jensen, 1976 kultiviert.

NaHCO₃-Lösung	8 %(w/v) NaHCO ₃ in H ₂ O _{reinst}
Ungepuffertes RPMI 1640-Medium	15,43 g RPMI 1640 ad 900 ml H ₂ O _{reinst} sterilfiltriert
Gepuffertes RPMI 1640-Medium	900 ml ungepuffertes RPMI 1640- Medium 40 ml NaHCO ₃ -Lösung
AlbumaxII-Lösung	5 %(w/v) AlbumaxII in ungepuffertem RPMI 1640-Medium
Komplettmedium	20 mM Glukose 0,05 mg/ml Gentamycinsulfat 0,25 %(v/v) AlbumaxII-Lösung in gepuffertem RPMI 1640-Medium
Erythrocyten	50 % (v/v) Hämatokrit in Komplettmedium

Die Parasitenkulturen wurden entweder in 100 ml Komplettmedium mit 2,5 % Hämatokrit in 250 ml Kulturflaschen (FCBR) gehalten oder in Petrischalen in einem Volumen von 10 ml mit 4 % Hämatokrit (3D7 am BNI). Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank unter sauerstoffarmer Atmosphäre (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂, Air Liquide) bei 37 °C. Mindestens alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt.

Passagen

Steigt die Parasitämie einer *P. falciparum*-Kultur *in vitro* zu hoch an, kommt es zum Absterben der Parasiten. Eine unsynchrone Parasitenkultur wurde ab einer Parasitämie von 7 % verdünnt, synchrone Ringstadien ab 10 % und Trophozoiten bzw. Schizonten ab 5 % Parasitämie.

3.1.3 Mikroskopische Darstellung von *P. falciparum* mittels Giemsa-Färbung

100 % (v/v) MeOH

Giemsa-Puffer

3,6 mM KH₂PO₄

6,1 mM Na₂HPO₄

Giemsa-Färbelösung

10 % (v/v) Giemsa-Lösung (Merck)

in Giemsa-Puffer

Die mikroskopische Untersuchung der Parasitenstadien und die Bestimmung der Parasitämie wurden mit Hilfe von Giemsa-gefärbten Ausstrichen durchgeführt. Hierfür wurden auf Glasobjektträgern dünne Blutausstriche angefertigt, die im Luftstrom der Sterilbank getrocknet wurden. Anschließend wurden die Ausstriche für 30 s in 100 % Methanol fixiert und in der Giemsa-Färbelösung für mindestens 10 min gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde mit Leitungswasser abgewaschen, die Ausstriche getrocknet und bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv mikroskopisch untersucht. Für die Bestimmung der Parasitämie wurden mindestens 500 Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil an infizierten Erythrocyten berechnet. Mehrfachinfektionen wurden einfach gezählt.

3.1.4 Einfrieren von Plasmodien

Einfrierlösung

30 % (w/v) Glycerin in PBS

Das Einfrieren von Parasiten überleben nur die Ringstadien einer Parasiten-Kultur. Als Ausgangsmaterial wurde deshalb eine Parasitenkultur verwendet, die aus mindestens 3 % Ringstadien bestand. Diese wurde bei 800×g für 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand wurde sorgfältig abgenommen. Anschließend wurden zu dem Zellsediment zwei Volumen der Einfrierlösung hinzugefügt und die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert. 500 µl dieser Zellsuspension wurden in Cryo-Röhrchen überführt und für 10 min auf Eis abgekühlt. Die Lagerung erfolgte anschließend in flüssigem Stickstoff.

3.1.5 Auftauen von Plasmodien

Auftaulösung 1

27 % (w/v) D-Sorbitol in PBS, pH7,4

Auftaulösung 2

5 % (w/v) D-Sorbitol in PBS, pH7,4

Die im Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden zwei Volumenteile (VT) der kalten Auftaulösung 1 tropfenweise unter Schütteln hinzugefügt und das Röhrchen für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden in zwei Volumenteile der kalten Auftaulösung 2 tropfenweise hinzugefügt und für weitere 10 min auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden bei 4 °C für 5 min bei 800×g ohne Bremse sedimentiert und in zwei VT kalter Auftaulösung 2 vorsichtig resuspendiert. Nach weiteren 8 min auf Eis wurden die Zellen erneut bei 4 °C für 5 min bei 800×g ohne Bremse zentrifugiert. Sie wurden zwei Mal mit 1 ml Kompletmedium gewaschen und unter Standardbedingungen kultiviert.

3.1.6 Synchronisation einer *P. falciparum*-Kultur mit D-Sorbitol

Komplettmedium**Sorbitollösung**5 % (w/v) D-Sorbitol in H₂O_{reinst}

Die Behandlung einer unsynchron wachsenden *Plasmodium*-Kultur mit D-Sorbitol ermöglicht eine Synchronisation des Parasitenwachstums. Das Sorbitol dringt in die späten Stadien ein und mit der Zugabe von Komplettmedium platzen diese aufgrund eines osmotischen Schocks, so dass eine Kultur aus Ringstadien erhalten bleibt (Lambros und Vanderberg, 1979).

Die Zellen einer unsynchronen Kultur wurden bei 500×g sedimentiert und mit 9-fachem Sediment-Volumen in Sorbitollösung resuspendiert. Die Zellen wurden immer wieder geschwenkt, bis nach 10 min das Gesamtvolumen mit Komplettmedium verdoppelt wurde. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert und einmal mit Komplettmedium gewaschen. Die Ringstadien, die nach der Sorbitolbehandlung übrig waren, wurden unter Standardbedingungen weiterkultiviert. Um eine hochsynchron Parasitenkultur zu erhalten wurde die Sorbitolbehandlung nach spätestens 12 h wiederholt.

3.1.7 Anreicherung von *P. falciparum* FCBR-Trophozoiten über Gelafundin

Komplettmedium**Gelafundin**

4 % (w/v) Gelafundin

Der *P. falciparum*-Stamm FCBR bildet während seiner Entwicklung in den Erythrocyten sogenannte *Knobs* auf der RBC-Oberfläche (Kilejian, 1979). Diese *Knobs* verändern die Sedimentationseigenschaften der infizierten Zellen, so dass nicht infizierte RBC schneller zu Boden sinken als mit Trophozoiten infizierte RBC. Damit die Parasiten diese Eigenschaft behalten, wurden sie mindestens einmal pro Woche mit Gelafundin behandelt. Die Zellen einer synchron wachsenden Trophozoiten-Kultur des Stammes FCBR, wurden bei 500×g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 1,4-fachen Sediment-Volumen Komplettmedium und 2,4-fachen Sediment-Volumen Gelafundin resuspendiert und für 15 min aufrecht in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Die herabsinkenden Zellen durften nicht aufgewirbelt werden, so dass der Überstand anschließend vorsichtig abgenommen werden konnte. Der Überstand, der die flotierenden, *Knobs*-tragenden infizierten RBC (iRBC) enthält, wurde bei 800×g zentrifugiert und mit Komplettmedium

gewaschen. Die Zellen wurden entweder unter Standardbedingungen weiterkultiviert oder für Experimente verwendet.

3.1.8 Anreicherung von Schizonten über Percoll

Komplettmedium

Percoll-Lösung 65 % (v/v) Percoll in PBS

Die Anreicherung von Schizonten über Percoll wurde verändert nach Kutner *et al.*, 1985 durchgeführt. Die Zellen einer synchron wachsenden Kultur mit Schizonten wurden bei RT für 5 min bei 550 ×g sedimentiert und in 5 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig auf 25 ml der Percoll-Lösung geschichtet und bei RT für 20 min bei 1500 ×g ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen, die sich an der Phasengrenze von Percoll und PBS gesammelt haben abgenommen und in PBS gewaschen.

3.1.9 Isolierung von Merozoiten

EGTA-Stammlösung 100 mM EGTA in PBS

Zu einer synchron wachsenden Kultur aus späten Stadien mit einer Parasitämie von 3-5 % wurde final 1 mM EGTA hinzugefügt. Nach 12-15 h wurde die gesamte Kultur inklusive Medium bei 500 ×g für 5 min bei RT sedimentiert und der Überstand in neue Zentrifugenröhrchen überführt. Diese wurden ein zweites Mal bei 700 ×g für 5 min bei RT ohne Bremse sedimentiert und der Überstand sorgfältig, ohne das Sediment aufzunehmen nochmals in frische Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Merozoiten bei 1500 ×g für 20 min bei RT sedimentiert und in PBS+PIC gewaschen.

3.2 Membranpräparation von infizierten Erythrocyten und Merozoiten

Lysepuffer , pH 8,0	10 mM Tris 1 mM EGTA 1× PIC (frisch)
Hochsalzpuffer , pH 7,5	10 mM HEPES 0,6 M KCl 3 mM MgCl ₂ 5 mM DTT (frisch) 1× PIC (frisch)
Karbonatpuffer , pH 11,0	0,1 M NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ 1 mM EDTA
PIC , 50× Stammlösung	1 Tablette in 1 ml H ₂ O _{reinst}

Die infizierten und nicht infizierten Erythrocyten wurden in Lysepuffer resuspendiert und auf Eis stehend für 10 min lysiert. Anschließend wurden die Membranen bei 4 °C für 15 min bei 20000 × g sedimentiert und mit Lysepuffer gewaschen bis die Membranen weiß waren. Merozoiten wurden ebenfalls in Lysispuffer aufgenommen und durch 10 *Freeze and Thaw*-Zyklen lysiert. Die Membranen wurden in der Ultrazentrifuge bei 40000 rpm für 1 h bei 4 °C sedimentiert. Zusätzlich wurden die Membranen mit Hochsalz- und Karbonatpuffer gewaschen, um peripher assoziierte Membranproteine zu entfernen. Die Überstände der Waschschritte wurden vereinigt und mittels TCA gefällt.

Die isolierten Membranen wurden direkt in 3× SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 50 °C für 1 h bei 400 rpm im Thermomixer gelöst. Unlöslich Bestandteile wurden bei RT für 20 min bei 20000 ×g abzentrifugiert und der Überstand wurde in einer SDS-PAGE eingesetzt.

3.3 Elektroporation von *P. falciparum* 3D7

Cytomix, pH 7,6	10 mM K ₂ HPO ₄
	5 mM MgCl ₂
	120 mM KCl
	0,15 mM CaCl ₂
	25 mM HEPES,
	2 mM EDTA
WR99210-Arbeitslösung	5 µM WR99210 in Kompletmedium

Die gentechnische Veränderung von *P. falciparum*-Parasiten und ihre Kultivierung wurde von Dr. Ingrid B. Müller und Dr. Carsten Wrenger in der Abteilung für Biochemische Parasitologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt.

Klonierung des Transfektionsvektors pARL1a

Für die stabile Transfektion von *P. falciparum* 3D7 wurde der Vektor pARL1a (WR) (Crabb *et al.*, 2004) verwendet. Dieser trägt als Selektionsmarker das Gen für die humane Dihydrofolat-Reduktase (hDHFR). Die hDHFR ist im Vergleich zur plasmodialen DHFR weniger sensitiv gegenüber dem Pyrimethamin-Analogon WR99210, so dass nicht-transgene Parasiten bei Zugabe von WR99210 nicht überleben. In die MCS des Vektors wurde über die XhoI-Schnittstelle die Sequenz für das *Green Fluorescent Protein* (GFP) kloniert. Der *Forward-Primer* enthielt hierbei eine AvrII-Schnittstelle. Die Offenen Leserahmen (ohne Stoppcodon) der Zielgene wurden mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten die Restriktionsschnittstellen KpnI und AvrII. Sowohl die PCR-Produkte, als auch der Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen KpnI und AvrII geschnitten und wurden so miteinander ligiert (Müller *et al.*, 2009).

Elektroporation von Parasiten im Ringstadium

Die Transfektion von *P. falciparum* 3D7 wurde mittels Elektroporation von Ringen nach Knöckel, 2009 durchgeführt. Es wurde eine synchrone Kultur, die zu ca. 5% aus Ringen bestand, sedimentiert. 200 µl der gepackten Zellen wurden mit 250 µl Cytomix und 100-150 µg DNA gemischt. Die Suspension wurde in Elektroporationsküvetten gefüllt und im *GenePulser* bei 310 V und 900 µF elektroporiert. Die so behandelten Zellen wurden in 10 ml RPMI 1640-Medium überführt, mit 300 µl frischen Erythrozyten versetzt und bis zum nächsten Tag ohne Selektionsdroge kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut

gewechselt und mit 50 nM WR99210 versehen. Dies wurde in der ersten Woche nach der Transfektion täglich, danach alle zwei Tage wiederholt, bis Transfektanden zu beobachten waren.

3.4 GFP-*Live Imaging*

Die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine in transgenen Parasiten wurde mit lebenden Parasiten in Hamburg am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin durchgeführt. 40 µl der Parasitenkultur, die zusätzlich mit Hoechst 33258 angefärbt wurde, wurden auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus (Software OpenLab5) untersucht und fotografiert.

3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Fixierlösung	4 % Paraformaldehyd 0,0075 % Glutaraldehyd in PBS, pH7,4
NH₄Cl-Lösung	50 mM NH ₄ Cl in PBS
Permeabilisierungslösung	0.1 % Triton X-100 in PBS
Blockierlösung	3 % BSA in PBS

Die Immunfluoreszenzmikroskopie diente zum indirekten Nachweis subzellulärer Bestandteile und ihrer Lokalisation. Hierfür wurden Zellen, die sich in Suspension befanden, wie z.B. *P. falciparum*, auf Objektträgern ausgestrichen und getrocknet. Adhärenz wachsende Zellen, wie z.B. HEK293, wurden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden bei RT für 30 min mit Fixierungslösung fixiert, mit PBS gewaschen und dann für weitere 30 min mit der NH₄Cl-Lösung inkubiert. Nachdem die NH₄Cl-Lösung mit PBS abgewaschen wurde, wurden die Zellen für 15 min mit Triton X-100 permeabilisiert, mit PBS gewaschen und anschließend bei RT für mindestens 1 h oder bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer mit Blockierungslösung blockiert. Die Antikörper wurden in Blockierungslösung angesetzt und über Nacht bei 4 °C auf die Zellen gegeben. Zu den sekundären Antikörpern wurde der Farbstoff Hoechst 33258 in einer Konzentration von 2 µg/ml hinzugefügt, um die Zellkerne anzufärben. Zwischen dem ersten und zweiten Antikörper wurden die Zellen gründlich in PBS gewaschen. Nachdem auch der

überschüssige zweite Antikörper abgewaschen wurde, wurden die Präparate in *MobiGlow Mounting Medium* (MoBiTec, Göttingen) eingebettet. Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 mit Apotom betrachtet.

3.6 Isolierung von RNA aus *P. falciparum*

Saponinlösung	0,1 %(w/v) Saponin in PBS
DEPC-Wasser	0,1% (v/v) DEPC, autoklaviert
70 % (v/v) EtOH in DEPC-Wasser	

RNA kann aus Parasiten aller Stadien isoliert werden (Kyes *et al.*, 2000). Es wurde für die Isolierung von RNA eine aus Trophozoiten und späten Stadien bestehende *P. falciparum* FCBR-Kultur verwendet. Diese wurde sedimentiert und die RBC wurden in 10-fachem Sedimentvolumen mit Saponinlösung auf Eis lysiert. Dieser Ansatz wurde bei 4 °C für 5 min bei 2500 ×g zentrifugiert und die sedimentierten Parasiten wurden in 1,5 ml *my-Budget RNAmagic* resuspendiert und nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde nach der Isolierung, Präzipitation und den Waschschritten mit 70 % EtOH für 5-10 min getrocknet und in 30 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden am Nano Drop ND-1000 gemessen. Um zu überprüfen, ob die RNA durch DNA verunreinigt war, wurden Intron-umspannende Primer in einer PCR eingesetzt und das Amplifikat in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die RNA wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.7 cDNA-Erststrangsynthese durch reverse Transkription

Während der reversen Transkription wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die anschließend in einer PCR eingesetzt werden kann. Die während der cDNA-Synthese verwendeten Oligo-dT-Primer hybridisieren an den Poly A-Schwanz der mRNA, so dass selektiv aus der Gesamt-RNA nur die mRNA als Matrize für die Reverse Transkriptase diene.

Die RNA wurde mit Hilfe der Superscript III Reverse Transkriptase und Oligo-dT-Primern nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Vervielfältigung eines definierten DNA-Fragmentes zwischen zwei Oligonukleotiden *in vitro*.

Es wurde in den meisten PCR-Anwendungen die Taq-Polymerase von Fermentas mit dem dazu gehörigen 10× Taq-Puffer (-MgCl₂) und der 25 mM MgCl₂-Lösung verwendet. Der dNTP-Mix bestand aus jeweils 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Fermentas). Sollte das Amplifikat in einer Klonierung weiterverwendet werden, wurde ein Gemisch aus Pwo- (Peqlab) und Taq-Polymerase im Verhältnis 1:20 verwendet. Die Pwo-Polymerase ist eine DNA-Polymerase mit einer zusätzlichen 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, die den Einbau falscher Nukleotide korrigieren sollte. Hierbei war zu beachten, dass die Elongations-Temperatur während der PCR auf 68 °C erniedrigt und die Elongationszeit verlängert werden musste. In Tabelle 5 ist die Zusammensetzung und in Tabelle 6 das Programm einer Standard-PCR zusammengefasst.

Tabelle 5: Pipettierschema einer Standard-PCR.

	Volumen, µl
Taq-Puffer, 10×	1
MgCl ₂ , 25 mM	0,8
<i>Forward-Primer</i> , 10 µM	1
<i>Reverse-Primer</i> , 10 µM	1
dNTP-Mix, 1 mM	1
DNA-Polymerase	0,05
DNA	1*
H ₂ O	4,15*
Gesamt	10

*Das Volumen von DNA und H₂O kann entsprechend der DNA-Konzentration angepasst werden.

Tabelle 6: Standard-Programm einer PCR mit Taq-Polymerase.

		Temperatur	Zeit
35 Zyklen	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
	Denaturierung	95 °C	30 s
	Hybridisierung	*	30 s
	Elongation	72 °C	**
	Finale Elongation	72 °C	5 min

* Primer-spezifische Hybridisierungstemperatur

** Amplifikat-spezifische Elongationszeit (1000 bp/min)

3.9 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer, pH 8,0	0,2 M Tris-Acetat 5 mM EDTA
Agarose-Lösung	1,5 %(w/v) Agarose in TAE-Puffer, durch Aufkochen gelöst
6x DNA-Ladepuffer, pH 8,0	50 % Glycerin 10 mM EDTA 0,1 % SDS 0,25 % Bromphenolblau

Die Agarosegele wurden in horizontalen Gelsystemen der Firma Peqlab gegossen und durchgeführt. Hierfür wurde die heiße Agaroselösung mit Ethidiumbromid versetzt und die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer vermischt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Um die Größe der DNA-Fragmente abzuschätzen, wurde zusätzlich auf jedes Gel ein DNA-Längenstandard (*GeneRuler™ DNA Ladder Mix* 100 – 10000 bp, Fermentas) aufgetragen. Zu Beginn der Elektrophorese wurde abhängig von der Gelgröße, eine Spannung von 30-50 Volt und, nachdem die Proben die Geltaschen verlassen hatten, von 70-100 Volt angelegt. Die DNA wurde durch das Ethidiumbromid in einem Transilluminator (PHASE, Lübeck) unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.10 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA in den Agarosegelen wurde auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und mit einem sauberen Skalpell möglichst exakt ausgeschnitten. Fragmente, die kleiner als 100 bp waren, wurden mit Hilfe von *Spin Columns* der Firma Ambion nach Herstellerangaben aus dem Gel herauszentrifugiert. Fragmente, die größer als 100 bp waren, wurden entweder mit dem *ExtractII-Kit* von Macherey-Nagel oder mit dem *peqGOLD Gel Extraction Kit* der Firma Peqlab nach Herstellerangaben gereinigt.

3.11 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen aus Bakterien schneiden doppelsträngige DNA sequenzspezifisch an ihrer palindromischen Erkennungssequenz, die aus bis zu acht Basen bestehen. Es wurden die *FastDigest* Restriktionsenzyme von Fermentas verwendet, um gereinigte PCR-Amplifikate oder Plasmide zu schneiden. Die Restriktionsansätze wurden nach Herstellerangaben pipettiert und die empfohlene Inkubationszeit (5 min/0,2 µg PCR-Produkt oder 1 µg Plasmid-DNA) wurde in der Regel verdreifacht um eine vollständige Restriktion zu gewährleisten.

3.12 Ligation

3.12.1 Direkte Ligation von PCR-Produkten in pDRIVE und pJET1.2

Die direkte Ligation von gereinigten PCR-Produkten, die nicht mit Restriktionsenzymen geschnitten wurden, wurde nach Herstellerangaben mit dem PCR *Cloning Kit* von Qiagen oder dem CloneJET™ PCR *Cloning Kit* von Fermentas durchgeführt. Das PCR *Cloning Kit* von Qiagen beinhaltet den für das UA-Cloning geeigneten Vektor pDRIVE, in den PCR-Fragmente mit von der Taq-angehängtem 3'-A-Überhang ligiert werden können. Das CloneJET™ PCR *Cloning Kit* von Fermentas beinhaltet den für das *Blunt-End-Cloning* geeigneten Vektor pJET1.2, in den PCR-Fragmente mit glatten Enden ligiert werden können.

3.12.2 Ligation von Expressionsvektoren

Die Ligation von PCR-Amplifikaten, die mit Restriktionsenzymen geschnitten wurden, in Expressionsvektoren wurde mit der T4-DNA-Ligase von Fermentas durchgeführt. Dieses Enzym aus dem Bakteriophagen T4 kann sowohl glatte als auch überhängende Restriktionsenden verknüpfen, indem es die Bildung der Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden doppelsträngiger DNA katalysiert. Die Ligationsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl nach Herstellerangaben angesetzt und entweder über Nacht bei 4 °C oder für mindestens 3 h bei 22 °C im Thermomixer inkubiert.

3.13 Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen

Puffer I	30 mM Kaliumacetat
sterilfiltriert	50 mM MnCl ₂
	100 mM KCl
	10 mM CaCl ₂
	15 %(w/v) Glycerin
Puffer II	10 mM MOPS
sterilfiltriert	75 mM CaCl ₂
	10 mM KCl
	15 % (w/v) Glycerin

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden die Bakterien mit CaCl₂ behandelt. Diese Behandlung führt zu einer erhöhten Aufnahme von DNA durch die Bakterien (Cosloy and Oishi, 1973).

Die Bakterien einer Übernachtskultur wurden 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer Optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,48-0,5 kultiviert (37 °C, 220 rpm). Die Bakterien wurden anschließend auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5 min, 3000 rpm, 4 °C). Das Zellsediment von 50 ml Kultur wurde in 15 ml Puffer I resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (5 min, 3000 rpm, 4 °C) und das Zellsediment wurde in 4 ml Puffer II aufgenommen. 50 µl Aliquots dieser Zellsuspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.14 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

SOC-Medium	2 %(w/v) Trypton
	0,5 %(w/v) Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	25 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen diente entweder der Amplifikation von Plasmiden (meist in *E. coli* DH5 α) oder für die Herstellung von bakteriellen Expressionssystemen (*E. coli* trxB).

50 μ l kompetente *E. coli*-Zellen wurden zusammen mit 2-5 μ l der zu transformierenden Ligationsansätze oder der verdünnten Plasmid-DNA gemischt und auf Eis für 30 min aufgetaut. Anschließend wurde der Ansatz für 30-60 s auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock) und mit 800 μ l kaltem SOC-Medium abgekühlt. Die Zellen wurden bei 37 °C für 40 min bei 800 rpm geschüttelt und anschließend auf LB-Antibiotika-Platten ausgestrichen. Diese wurden dann bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

3.15 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterien wurde mit Hilfe des Nucleospin® *Plasmid Quick Pure Kits* von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.16 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung klonierter Plasmide wurde von der Firma Seqlab, Göttingen und von der Firma GATC, Konstanz durchgeführt.

3.17 Herstellung und Reinigung von Pf15N in *E. coli*

Pf15N ist die N-terminale Domäne des Proteins Pf15.2 zwischen Signalpeptid und Transmembrandomäne. Es wurde in *E. coli* BL21 (DE3) trxB rekombinant als GST-Fusionsprotein synthetisiert, anschließend gereinigt und von seinem GST-Anhang abgespalten.

3.17.1 Klonierung des Expressionsvektors pGEX2T-Pf15N

Für die Klonierung des Expressionsvektors für die rekombinante Expression von Pf15N (Abbildung 12) wurde RNA aus *P. falciparum* isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der genspezifischen Primer

Pf15.2aF2: 5`-ggatccCACGGATGGAAAAATA-`3 und

Pf15.2aR2: 5`-gaattcttattaATAATATTCAATCATCTC-`3

wurde die Zielsequenz innerhalb des Gens für Pf15.2 amplifiziert und in pDRIVE ligiert.

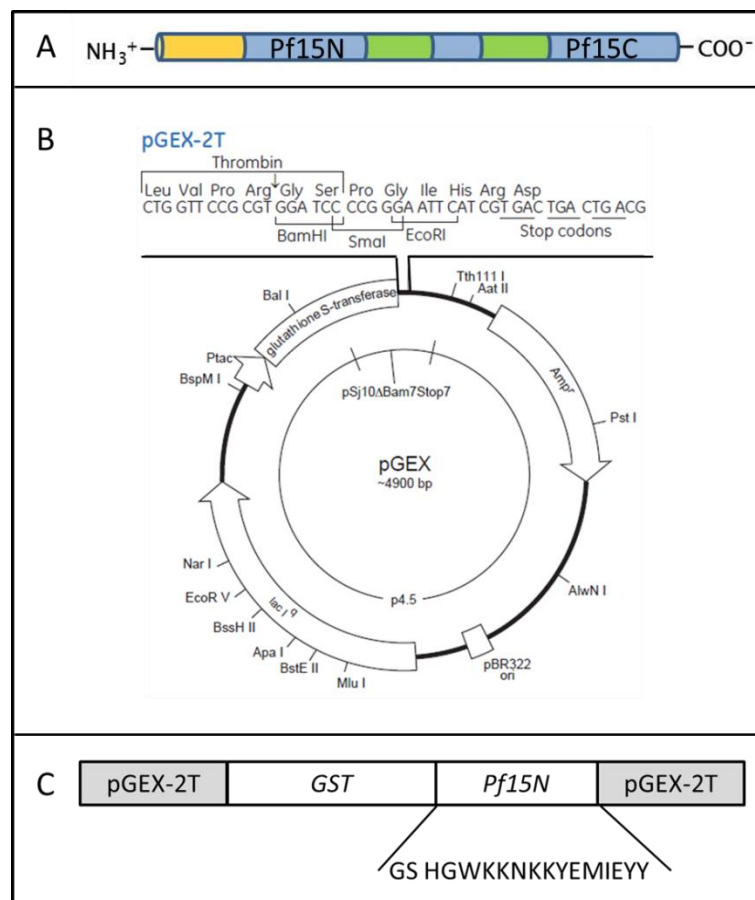


Abbildung 12: (A) Schematische Darstellung des Proteins Pf15 mit der Einteilung in Pf15N und Pf15C. Das Signalpeptid ist in orange, N- und C-terminale Domänen (Pf15N, Pf15C) sind in blau und die Transmembrandomänen in grün dargestellt (TMD). **(B) Vektorkarte von pGEX-2T mit detaillierter MCS Abbildung von GE Healthcare.** **(C) Klonierungsschema von pGEX2T-Pf15N.** Pf15N wird als Fusionsprotein mit N-terminalem Glutathion S-Transferase (GST)-Anhang synthetisiert. Die Aminosäuresequenz des löslichen Pf15N ohne GST-Anhang ist dargestellt. Nach Abspaltung des GST-Restes bleiben N-terminal zwei AS (GS), die nicht zur nativen Sequenz von Pf15N gehören.

Nachdem der pDRIVE-Pf15N-Vektor amplifiziert und sequenziert wurde, wurde das Genfragment mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI (Fermentas) herausgeschnitten und in den Vektor pGEX-2T, der ebenfalls mit BamHI und EcoRI geschnitten wurde, ligiert. Der Vektor wurde abschließend sequenziert und als pGEX2T-Pf15N bezeichnet (Abbildung 12).

3.17.2 Expression von GST-Pf15N in *E. coli* BL21(DE3) *trxB*

LB_{Amp}-Medium

IPTG

1 M IPTG in H₂O_{reinst}

Die rekombinante Expression des Fusionsproteins GST-Pf15N erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) *trxB*. Die Bakterien wurden in LB_{Amp}-Medium in Schikane-Kolben aus einer Über-Nacht-Kultur 1:500 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 bei 37 °C und 220 rpm angezogen. Die Expression wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Bakterien wurden nach 4,5 h geerntet, das Feuchtzellgewicht bestimmt und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.17.3 Affinitätschromatografie mit Glutathion-Sepharose

PBS, pH 7,4

Elutionspuffer, pH8,0

20 mM Tris

15 mM Glutathion_{red}

Die löslichen Fusionsproteine mit GST-Anhang wurden mit Hilfe von Glutathion-Sepharose affinitätsgereinigt und somit von dem Großteil der *E. coli*-Proteine getrennt. Das Bakteriensediment wurde in 5 ml PBS/g Feuchtzellgewicht resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das Bakterienlysat wurde bei 20000 ×g zentrifugiert und der lösliche Überstand wurde nach Filtration durch einen Ø0,2 µm Spritzenfilter mit der Peristaltikpumpe in einer Geschwindigkeit von 1 ml/min auf die GSTrap 4B (5 ml Säulenvolumen (CV), GE Healthcare) geladen. Anschließend wurde die Säule mit 5 CV PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 5-6 CV Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.17.4 Abspaltung des GST-Anhanges mit Thrombin

Nachdem der Proteingehalt des Eluates mittels Proteinbestimmung nach Bradford bestimmt wurde, folgte die Thrombin-Spaltung mit 1 U Thrombin pro mg Fusionsprotein für 24 h bei 22 °C und 200 rpm.

3.17.5 Anionenaustauschchromatografie

Puffer A , pH 8,0	20 mM Tris
Puffer B , pH 8,0	20 mM Tris
	500 mM NaCl

Um den durch Thrombin abgespaltenen GST-Anhang (3.14.3) vom rekombinanten Pf15N zu separieren, wurde ein Anionenaustauscher, eine Resource Q-Säule, verwendet. Es wurde hierfür das Tris-HCl-Puffersystem mit pH 8,0 ausgewählt, wodurch die Probe nach der Thrombinspaltung nicht umgepuffert werden musste. Die GST hat einen theoretischen pI von 6,1 und Pf15N einen theoretischen pI von 8,34. Bei einem pH von 8,0 bindet die GST also an die Resource Q, wohingegen das Pf15N im Durchfluss zu finden ist. Die Resource Q-Säule wurde an den ÄKTA™purifier 10 angeschlossen und mit Puffer A äquilibriert. Die filtrierte Probe wurde in einer Geschwindigkeit von maximal 1 ml/min auf die Säule geladen. Der gesamte Durchfluss wurde aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer A gewaschen und mit Puffer B eluiert.

3.17.6 Protein-Konzentrierung über eine hydrophobe Matrix (SepPak)

Äquilibrierungs-/Waschlösung	0,1 % TFA
Elutionslösung	84 % ACN in 0,1 % TFA

Der Durchfluss der Anionenaustauschchromatografie wurde mit HCl angesäuert und über eine mit 100 % ACN aktivierte und äquilibrierte Sep Pak (500 mg, Waters) gegeben. Die hydrophobe Matrix wurde mit 2 CV der Waschlösung gewaschen und die gebundenen Proteine wurden mit mindestens 3 CV Elutionslösung eluiert. Das Eluat wurde bei -80 °C eingefroren und in der Lyophylle Alpha 2-4 LSC der Firma Christ bei -90 °C und in einem Vakuum 0,1 bis 0,2 mbar gefrieretrocknet. Dadurch wurden flüchtige Lösungsmittel wie

ACN oder TFA entfernt. Das Lyophilisat wurde in 1 mM HCl in kleinem Volumen rückgelöst.

3.18 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

3.18.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz	100 mg CBB G-250
	50 ml 95 % (v/v) EtOH
	100 ml 85 % (v/v) Phosphorsäure
	ad 1000 ml mit H ₂ O _{reinst}

1 N NaOH

Die Proteinbestimmung nach Bradford, 1976 nutzt den Farbstoff CBB G-250, der mit Proteinen Komplexe bildet und es dadurch zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 595 nm kommt. Voraussetzung ist, dass die Reaktion in basischem Milieu stattfindet, weshalb alle Proben mit 1 N NaOH verdünnt wurden. Als Referenzprotein zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde BSA in Konzentrationen zwischen 20 und 200 µg/ml verwendet. Zu 100 µl Probe wurden 900 µl Bradford-Reagenz gegeben und die Ansätze für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen bei 595 nm gemessen und mit Hilfe der BSA-Standardreihe eine Kalibriergerade erstellt, anhand derer der Proteingehalt der unbekanntem Proteinlösung bestimmt wurde.

3.18.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Test

Der BCA-Test wurde mit Hilfe des *Micro BCA Protein Assay Kits* von Pierce in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Referenzprotein für die Kalibrierreihe diente BSA. Die Messung erfolgte im Multiskan® MCC/340 von Titertek bei 570 nm.

3.18.3 Proteinbestimmung bei 280 nm

Handelte es sich bei der Proteinlösung um ein gereinigtes Protein, dessen Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) bekannt war, wurde die Proteinbestimmung am NanoDrop ND-1000 bei 280 nm durchgeführt. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes und dem Molekulargewicht wurde anhand der Extinktion der Proteingehalt der Probe berechnet.

Lambert-Beer

$$E = \epsilon * c * d$$

E = Extinktion

ϵ = Extinktionskoeffizient, $M^{-1} * cm^{-1}$

c = Konzentration, mol/l

d = Schichtdicke, cm

3.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.19.1 Reduktion und Alkylierung von Proteinen

6-fach SDS-Probenpuffer, pH6,8

0,35 M Tris

10,28 %(w/v) SDS

36 %(w/v) Glycerin

0,012 % (w/v) Bromphenolblau

DTT

2 M DTT in H_2O_{reinst}

IAA

1 M IAA in H_2O_{reinst}

Reduktion

Bevor die Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt wurden, wurden sie mit DTT reduziert und durch Erhitzen denaturiert. Die Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und es wurde DTT in einer Konzentration von 50 mM hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 60 °C erhitzt.

Alkylierung

Handelte es sich um Proteine, die nach der Elektrophorese massenspektrometrisch analysiert werden sollten, wurden die Proben nach der Reduktion mit 150 mM IAA für 15 min bei 45 °C alkyliert.

3.19.2 Elektrophorese

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen im Gel. Hierbei werden Gele verwendet, die durch Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylbisacrylamid entstehen. Durch die Verwendung des anionischen, denaturierenden Detergenz SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert und die Auftrennung erfolgt nach ihrem Molekulargewicht.

Es wurden die vertikalen Mini (10×10 cm)- und Midi (20×20 cm)-Gelapparaturen von Peqlab verwendet. Der Gellauf erfolgte für 30 min bei 20 mA/Gel und wurde bei 45 mA fortgesetzt bis die Lauffront das Gelende erreicht hat.

3.19.2.1 Tris/Tricin-Gele

Anodenpuffer , pH8,9	200 mM Tris-HCl
Kathodenpuffer , pH8,4	100 mM Tris-HCl
	100 mM Tricin
	0,1 % (w/v) SDS
3× Gelpuffer , pH 8,45	3 M Tris-HCl
	0,3 % (w/v) SDS
APS	40%(w/v) in H ₂ O _{reinst}

Das Tris/Tricin-Gelsystem, verändert nach Schägger und von Jagow, 1987, ist besonders geeignet für die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von bis zu 100 kDa. Es werden zwei verschiedene Laufpuffer während der Elektrophorese verwendet. Im Kathodenpuffer dient Tricin als Folgeion. Es wurden diskontinuierliche Gele, bestehend aus einem niederprozentigen Sammelgel (4 %) und einem 13 %igen Trenngel verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 7 aufgelistet ist.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels im Tris/Tricin-Gelsystem.

	Trenngel, 13 % (40ml)	Sammelgel, 4 % (20 ml)
Acrylamid 2K-Lösung	-	2,70 ml
Rotiphorese Gel 30	17,30 ml	-
3 × Gelpuffer	13,30 ml	6,70 ml
Glycerin (87 %)	8,00 ml	-
H ₂ O _{reinst}	1,40 ml	10,60 ml
TEMED	20 µl	20 µl
APS	40 µl	40 µl

3.19.2.2 Tris/Glycin-Gele

4× Trenngelpuffer, pH8,8	1,5 M Tris 0,4 %(w/v) SDS
4× Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,5 M Tris 0,4 %(w/v) SDS
APS	40 %(w/v) APS in H ₂ O _{reinst}
Laemmli-Elektrophorese-Puffer, pH8,3	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 %(w/v) SDS

Das Tris/Glycin-Gelsystem nach Laemmli, 1970 ist besonders geeignet für die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 50 und 200 kDa. Glycin dient im Elektrophoresepuffer als Folgeion. Es wurden diskontinuierliche Gele verwendet, die aus einem niederprozentigen Sammelgel (4 %) und entweder aus einem 10 %igen Trenngel oder einem 8-15 %igen Gradientengel bestanden, deren Bestandteile in Tabelle 8 zusammengefasst sind. Die Gradientengele wurden mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und einer Gelmischapparatur gegossen.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels im Tris/Glycin-Gelsystem.

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	Gradientengel		4 %
		8 %	15 %	
Acrylamid 2K-Lösung	-	-	-	1,33 ml
Rotiphorese Gel 30	6,65 ml	5,32 ml	9,98 ml	-
4 × Gelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml	2,5 ml
Glycerin (87 %)	-	-	3,39 ml	0,1 ml
H ₂ O _{reinst}	8,05 ml	9,38 ml	-	6 ml
TEMED	6,65 µl	6,65 µl	6,65 µl	12,5 µl
APS, 40 % (w/v)	25 µl	25 µl	25 µl	5 µl

3.20 Färbung von Proteinen im Gel

Zur Darstellung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Gel wurde entweder eine Proteinfärbung mit kolloidaler Coomassie-Lösung nach Kang *et al.*, 2002 durchgeführt oder die Proteine wurden mittels Silbernitratfärbung modifiziert nach Heukeshooven und Dernick, 1988 sichtbar gemacht.

3.20.1 Proteinfärbung mit kolloidaler Coomassie-Lösung

Fixierlösung	30 % (v/v) EtOH
	2 % (v/v) Phosphorsäure
Färbelösung	5 % (w/v) Aluminiumsulfat
	10 % (v/v) EtOH
	0,02 % (w/v) CBB-G250
	2 % (v/v) Phosphorsäure
Entfärber	10 % (v/v) EtOH
	2 % (v/v) Phosphorsäure

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel in H₂O gespült und für 30 min in Fixierlösung fixiert (optional). Die Färbung erfolgte über Nacht mit der Färbelösung auf einem Schütteltisch. Zum Entfärben des Gels wurde der Entfärber mehrere Male gewechselt.

3.20.2 Proteinfärbung mit Silbernitrat

Lösung 0 , pH8,2	5 % (v/v) Glutardialdehyd 0,16 M Borsäure
Lösung 1	40 % (v/v) EtOH 10 % (v/v) Essigsäure
Lösung 2	30 % (v/v) EtOH 6,8 % (w/v) Natriumacetat 0,125 % (v/v) Glutardialdehyd 0,2 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃
Lösung 3	H ₂ O _{reinst}
Lösung 4	0,25 % (w/v) AgNO ₃ 0,015 % (v/v) Formaldehyd
Lösung 5 , pH 11,5	2,5 % (w/v) Na ₂ CO ₃ 0,0074 % (v/v) Formaldehyd
Lösung 6	1,5 % (w/v) EDTA

Die Silbernitratfärbung wurde vor allem eingesetzt, wenn es sich um geringe Proteinmengen oder besonders kleine Proteine handelte, die im Gel nachzuweisen waren. Lösung 0 wurde nur zur Quervernetzung eingesetzt, wenn die Proteine kleiner als 15 kDa waren. Das Gel wurde nach der Elektrophorese in den Lösungen 0, 1 und 2 für jeweils 10 min geschwenkt und anschließend 5 Mal für 5 min in H₂O_{reinst} gewaschen. Es folgte die Inkubation in Lösung 4 für weitere 20 min. Überschüssige Lösung 4 wurde kurz mit H₂O_{reinst} abgespült, bevor das Gel mit Lösung 5 entwickelt wurde, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Die Entwicklung wurde mit Lösung 6 gestoppt.

3.21 Massenspektrometrische Analyse

3.21.1 Vorbereitung der Proben

Entfärbelösung	50 %(v/v) ACN 12,5 mM ABC
Trypsinpuffer	50 mM ABC 5 %(v/v) ACN

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proteine erst reduziert und alkyliert und anschließend in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden in den Gelen mit der Massenspektrometrie-kompatiblen Coomassie-Färbelösung gefärbt und ausgestanzt oder ausgeschnitten. Als nächstes folgte die tryptische Spaltung der Proteine in den Gelstücken. Diese wurden dafür erst in Wasser gewaschen und dann gründlich in Entfärbelösung entfärbt. Dies erfolgte gegebenenfalls über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Gelstücke in 100 % ACN dehydriert, bevor 100 ng Trypsin (Promega) in Trypsinpuffer kleinem Volumen (kleine Gelspots: 20 µl, große Gelstücke: 50 µl) hinzugefügt wurden. Sobald die Gelstücke die Trypsinlösung vollständig aufgesaugt hatten, wurde Trypsinpuffer hinzugefügt, so dass die Gelstücke knapp bedeckt waren. Sie wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Spaltung wurde durch die Zugabe von 0,3 % TFA in ACN gestoppt und der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Zu den Gelstücken wurde dann 100 % ACN hinzugefügt, um die Gelstücke einzuschumpfen und es folgte eine 10 minütige Behandlung im Ultraschallbad. Dieser Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereinigt und in der Vakuumentrifuge SpeedVac eingedampft. Die eingetrockneten Proben wurden dann an Dr. T. Overrath vom Institut für Experimentelle Medizin übergeben und dort massenspektrometrisch analysiert.

3.21.2 Durchführung der massenspektrometrischen Analyse

Die weitere Verarbeitung der Proben und die massenspektrometrische Analyse wurden von Dr. T. Overrath am Institut für Experimentelle Medizin in der Abteilung von Prof. Tholey für Systematische Proteomforschung durchgeführt. Die methodischen Angaben stammen aus dem Auftrags-Report von Dr. T. Overrath.

Die eingetrockneten, trypsinisierten In-Gel-Spaltung-Eluate wurden in 12 µl 0,1 % TFA/3 % MeCN gelöst, in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. 10 µl der Proben wurden an einer Ultimate 3000 nano-HPLC (DIONEX) über C18 Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt und mittels nano-LC-ESI-MS an einem LTQ Velos Orbitrap mit ETD-Massenspektrometer (Thermo Scientific) analysiert, das mit einer nano *Electro Spray*-Quelle ausgerüstet war. Die MS-Spektren wurden im Orbitrap-Massenanalysator aufgenommen. Die Interpretation der Fragmentspektren erfolgte über den Proteom *Discoverer V 1.1* (Thermo Scientific) und den darin implementierten Sequest-Algorithmus. Die Daten für die Proteinidentifizierung wurden über www.uniprot.org bezogen und es wurden alle Einträge für *Plasmodium falciparum* verwendet. Als Suchparameter wurde als Enzym Trypsin mit zwei erlaubten verpassten Spaltstellen gewählt. Die Carbamidomethylierung von reduzierten Cysteinresten und die Oxidation von Methionin wurden als Modifikationen berücksichtigt. Als Fehlertoleranz in der Peptidmasse wurde 10 ppm gewählt. Es mussten mindestens zwei Peptide mit hoher Wahrscheinlichkeit ($p \leq 0,01$) oder drei Peptide mit mäßiger Wahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$) zugeordnet werden, damit ein Protein als identifiziert eingestuft wurde.

3.22 Western Transfer von Proteinen auf eine Membran

Zum Transfer von Proteinen verändert nach Towbin *et al.*, 1979 aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran wurden zwei Verfahren verwendet. Für Proteine unter 50 kDa Molekulargewicht wurde das *Semi Dry Blotting* durchgeführt. Handelte es sich auch um Proteine größer als 50 kDa wurde das Tank Blot-Verfahren angewendet.

3.22.1 *Semi Dry Blotting*

10× Laemmli Elektrophorese-Puffer, pH8,3	250 mM Tris
	1,92 M Glycin
	1 % (w/v) SDS
Transferpuffer	20 % (v/v) MeOH
	in Laemmli Elektrophorese-Puffer
100 % (v/v) MeOH	

Für das *Semi Dry Blotting* wurden die *Semi Dry Blotting*-Apparaturen der Firmen PHASE und Peqlab verwendet. Die Filterpapiere und die PVDF-Membran wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und folgendermaßen auf die Anodenplatte der *Blotting*-Apparatur geschichtet: Auf fünf in Transferpuffer getränkte Filterpapiere wurde die in MeOH aktivierte und in Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran gelegt. Auf die Membran wurde dann das SDS-Gel mit den zu transferierenden Proteinen platziert. Abschließend folgten wieder fünf Filterpapiere mit der Kathodenplatte der Blottingapparatur. Der Transfer erfolgte bei $1,5 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h.

3.22.2 *Tank Blot*-Verfahren

10× Tank Blot-Puffer	2 M Glycin 250 mM Tris
TB-Transfer-Puffer	20 % (v/v) MeOH in Tank Blot- Puffer
100 % (v/v) MeOH	

Für das *Tank-Blotting* wurde der *PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web M* der Firma Peqlab verwendet. Die Filterpapiere und die PVDF-Membran wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und in TB-Transferpuffer luftblasenfrei in die *Blotting*-Kassette geschichtet. Auf die Fasermatte der Kathodenseite wurde ein Filterpapier gelegt. Darauf folgten das SDS-Gel und die in MeOH aktivierte PVDF-Membran. Abschließend wurden wieder ein Filterpapier und eine Fasermatte auf Seiten der Anode platziert. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1-1,5 h mit Kühlung.

3.22.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Membran

TTBS	0,05 % (w/v) Tween-20 in TBS
Blockierungslösung	5 % (w/v) BSA in TBS
AP-Puffer	100 mM Tris 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂
BCIP-Lösung	0,5 g BCIP in 10 ml DMF
NBT-Lösung	0,5 g NBT 7 ml DMF ad 10 ml H ₂ O _{reinst}
Färbelösung	33 µl BCIP-Lösung 66 µl NBT-Lösung 10 ml AP-Puffer

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran für mindestens 1 h bei RT in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper, verdünnt in Blockierungslösung, über Nacht bei 8 °C auf einem Rolltisch in 50 ml-Zentrifugenröhrchen gedreht. Nach mehrmaligem Waschen (mindestens 3 Mal für 10 min) in TTBS wurde der zweite Antikörper mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase (1:15000 verdünnt in Blockierungslösung) für mehrere Stunden bei 8 °C auf die Membran gegeben. Die Membran wurde schließlich in TTBS gewaschen und in AP-Puffer äquilibriert, bevor die Färbung mit der Färbelösung durchgeführt wurde. Die Farbreaktion wurde mit H₂O_{reinst} gestoppt und die Membran wurde getrocknet.

3.23 Reinigung von Antikörpern mittels Affinitätschromatografie

3.23.1 Reinigung von IgG über eine HiTrap Protein A-Säule

Bindungspuffer, pH 7,0	20 mM Natriumphosphat-Puffer
Elutionslösung, pH 3,5	100 mM Zitronensäure
Auffangpuffer, pH 9,0	1 M Tris-HCl
RPMI-HEPES-Medium ohne Phenolrot	

Für die Anreicherung von IgG-Molekülen und die Entfernung von Serumbestandteilen aus Kaninchenserum wurden 10 ml Serum mit 10 ml Bindungspuffer gemischt, filtriert (\varnothing 0,2 μ m Spritzenfilter) und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (1 ml/min) auf die HiTrap-Protein A-Säule (1 ml CV, GE Healthcare) geladen. Die Säule wurde mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen und die Antikörper wurden mit der sauren Elutionslösung eluiert. Hierbei wurden je 800 μ l des Eluates direkt in 200 μ l der basischen Auffanglösung gesammelt, so dass die Antikörper nach der Elution wieder in neutralem pH-Bereich vorlagen (finale Pufferzusammensetzung der Antikörperlösung: 200 mM Tris, 80 mM Zitronensäure, pH 7,2-7,4). Sollten die Antikörper im Invasions-Assay eingesetzt werden, wurden sie mit Hilfe von Vivaspin 2-Konzentratoren (MWCO 10 kDa, Millipore) in phenolrotfreies RPMI-HEPES-Medium umgepuffert. Die Antikörperkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Tests bestimmt.

3.23.2 Reinigung von IgG mittels Thiol-Sepharose gekoppelter Peptide

Die spezifische Reinigung von Antikörpern wurde mit Hilfe der Immunisierungspeptide durchgeführt, die an Thiol-Sepharose gekoppelt wurden.

Bindung der Peptide an *Activated Thiol Sepharose* (GE Healthcare)

Bindungspuffer, pH 7,5	0,1 M Tris 0,5 M NaCl 1 mM EDTA
DTT-Lösung	5 mM DTT in Bindungspuffer

0,5 ml Säulenmaterial wurden in Bindungspuffer äquilibriert und mit 3 mg der Immunisierungspeptide EP053623 bzw. EP053624 von Pf15 über Nacht in einem Volumen von 1,5 ml bei 8 °C rollend inkubiert. Durch die Bindung von Peptiden an die aktivierte Thiolsepharose wird 2-Thiopyridon freigesetzt, das photometrisch bei 343 nm gemessen werden kann. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von 2-Thiopyridon ($\epsilon_{343} = 8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und dem Lambert-beer'schen Gesetz wurde die Bindungseffizienz kontrolliert. Die übrigen 2-Thiopyridon-Gruppen freier Bindungsstellen, an die die Peptide nicht gebunden haben, wurden mit DTT-Lösung freigesetzt. Das Säulenmaterial wurde in leere Plastiksäulen umgefüllt.

Reinigung der Antikörper

PBS, pH 7,4

Elutionslösung, pH 2,7

100 mM Glycin

0,5 M NaCl

Auffangpuffer, pH 9,0

1 M Tris-HCl

RPMI-HEPES-Medium ohne Phenolrot

Für die spezifische Reinigung von IgG-Molekülen wurden HiTrap-Protein A-gereinigte Antikörper verwendet. Der pH der Antikörperlösung wurde auf pH 7,4 eingestellt und mit dem Säulenmaterial inkubiert. Die Säule wurde mit 5 ml PBS gewaschen und die Antikörper wurden mit der sauren Elutionslösung eluiert. Das Eluat wurde direkt in der basischen Auffanglösung gesammelt, so dass die Antikörper nach der Elution wieder in neutralem pH-Bereich vorlagen. Sollten die Antikörper im Invasions-Assay eingesetzt werden, wurden sie mit Hilfe von Vivaspin 2-Konzentratoren (MWCO 10 kDa, Millipore) konzentriert und in phenolrotfreies RPMI-HEPES-Medium umgepuffert. Die Antikörperkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Tests bestimmt.

3.24 Viabilitäts-Assay mit SYTOX[®] Green

Reaktionslösung

11 μ M SYTOX[®] Green in 1,1 %
Nonidet-P40 in H₂O_{reinst.}

Der Viabilitäts-Assay wurde nach Evers *et al.*, 2008 durchgeführt. Es wurden Protein A-gereinigte Antikörper verwendet, die in RPMI-Medium vorlagen. Sie wurden in einer sterilen 96-well Flachboden-Mikrotiterplatte in einem Volumen von 100 μ l seriell verdünnt. Als Kontrollen dienten 2 μ M Chloroquin und Kompletmedium. Anschließend wurden 100 μ l einer Trophozoiten-Kultur mit 2 % Parasitämie und 5 % Hämatokrit hinzugefügt. Die Platten wurden sorgfältig begast und die Parasiten wurden für 48 h unter Standardbedingungen kultiviert. In jede Vertiefung wurden schließlich 20 μ l Reaktionslösung gegeben und die Platte wurde für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l aus jedem *Well* in eine neue Mikrotiterplatte überführt und im Spektra Fluor Mikrotiterplatten-Fluorometer der Firma Tecan bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt. Die Messung der Emission erfolgte bei 530 nm.

3.25 Invasions-Assays

Die Invasion von Merozoiten in Erythrocyten beruht auf Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Parasiten- und Wirtszelloberfläche. Diese Wechselwirkungen können sowohl auf Seiten der Parasiten, als auch auf Seite der Erythrocyten blockiert werden, so dass die Merozoiten nicht mehr in die RBC eindringen können. Die Blockierung der parasitären Oberflächenproteine kann durch Antikörper vermittelt werden. Die Oberflächenproteine der Erythrocyten wurden mit rekombinant hergestelltem Peptid inhibiert.

3.25.1 Invasions-Assay mit Antikörpern

3.25.1.1 Durchführung

Die Invasions-Assays wurden verändert nach O'Donnell *et al.*, 2001 durchgeführt. Es wurden mit Protein A-gereinigte Antikörper und Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Die Verdünnung der IgG erfolgte in dreifacher Ausführung in einem Volumen von 25 bzw. 50 µl in Kompletmedium. Als Positivkontrolle wurde der RPMI-HEPES Puffer ohne Phenolrot verwendet in dem die Antikörper vorlagen. Zu den Antikörperverdünnungen und der Positivkontrolle wurden 25 bzw. 50 µl einer hoch synchronen *P. falciparum* FCBR-Kultur, bestehend aus späten Trophozoiten und Schizonten, mit final höchstens 2 % Parasitämie und 2,5 % Hämatokrit hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten unter Standardbedingungen für 24 h inkubiert. Aus jeder Vertiefung wurden die Zellen ausgestrichen und die Parasitämie bestimmt.

3.25.1.2 Blockierung von Antikörpern

Die Protein A-gereinigten Antikörper wurden mit den Immunsierungspeptiden über Nacht bei 8 °C rollend in kleinem Volumen inkubiert. Überschüssige Peptide, die nicht gebunden haben, wurden mit Hilfe von Vivaspin 2-Konzentratoren (MWCO 10 kDa) in phenolrotfreies RPMI-HEPES-Medium umgepuffert. Die Antikörperkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Tests bestimmt.

3.25.2 Invasions-Assay mit rekombinantem Pf15N

Der Invasions-Assay mit rekombinantem Pf15N und den *Mock*-Peptiden *Mock*-8 und *Mock*-9 als Kontrollen wurde in Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Verdünnung des Peptids erfolgte in einem Volumen von 25 bzw. 50 μ l in Kompletmedium. Als Positivkontrolle wurde 1 mM HCl verwendet. Den Verdünnungen wurden 25 bzw. 50 μ l einer hoch synchronen *P. falciparum* FCBR-Kultur, bestehend aus späten Trophozoiten und Schizonten, mit final höchstens 2 % Parasitämie und 2,5 % Hämatokrit hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten unter Standardbedingungen für 24 h inkubiert. Aus jeder Vertiefung wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml PBS gewaschen, ausgestrichen und die Parasitämie bestimmt.

3.26 Bindungs-Assay

Der Bindungs-Assay wurde mit Pf15N und den *Mock*-Peptiden modifiziert nach Thompson *et al.*, 2001 durchgeführt. 50 μ l gepackte RBC wurden mit 200 μ l einer Peptid-Lösung (200 μ M in Phenolrot-haltigem RPMI-Medium) für 2 h bei RT inkubiert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf 500 μ l Silikonöl geschichtet. Anschließend wurden die Zellen bei RT für 30 s bei 12000 \times g durch das Öl zentrifugiert. Das aufgrund der niedrigeren Dichte über dem Silikonöl verbliebene Medium und das Silikonöl wurden getrennt voneinander abgenommen. Gebundene Peptide wurden dann mit 50 μ l 1,5 M NaCl-Lösung von den RBC für 15 min bei RT eluiert. Als Kontrollen wurden folgende Ansätze verwendet:

1. RBC und RPMI-Medium wurden **ohne** die Zugabe von Peptid auf das Silikonöl geschichtet, zentrifugiert und eluiert.
2. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 50 μ l gepackte RBC vorgelegt. Darauf wurden vorsichtig 500 μ l Silikonöl geschichtet. Auf das Silikonöl wurden dann 200 μ M Peptid in RPMI-Medium ohne RBC pipettiert. Auch hier wurde zentrifugiert und mit 1,5 M NaCl-Lösung eluiert.

3.27 Agglutinations-Assay mit Erythrocyten

3.27.1 Enzymbehandlung von Erythrocyten

Die Oberfläche von Erythrocyten (spätestens 11 Tage nach Blutentnahme) wurde mit den Enzymen Pronase, Trypsin, Proteinase K und Neuraminidase behandelt. Es wurden 200 μ l gepackte Zellen in PBS gewaschen und mit je 1 ml Enzymlösung (Tabelle 9, Enzyme wurden in PBS angesetzt) für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und regelmäßig geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen vier Mal mit 50 ml PBS gewaschen, bevor gegebenenfalls die Behandlung mit dem zweiten Enzym unter den oben genannten Bedingungen folgte. Nach Abschluss der Enzymbehandlung wurden die Zellen nochmals gründlich mit PBS gewaschen.

Tabelle 9: Eingesetzte Konzentrationen für die enzymatische Behandlung von RBC.

Enzym	Konzentration
Pronase	5,5 U/ml
Proteinase K	2 U/ml
Trypsin	1466 BAEE-U/ml
Neuraminidase	0,1 U/ml

3.27.2 Agglutinations-Assay

Die Agglutinations-Assays wurden in Spitzboden-Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden die Peptide Pf15N, *Mock-8* und *Mock-9* in Konzentrationen von 200 bis 1,5 μ M mit unbehandelten und enzymbehandelten RBC (Tabelle 10) getestet. Die serielle 1:2-Verdünnung der zu testenden Peptide wurde in einem Volumen von 50 μ l in PBS durchgeführt. Anschließend wurden 50 μ l einer Erythrocytensuspension mit einem finalen Hämatokrit von 1,5 % in PBS hinzugefügt. Die Platte wurde für 2 h bei RT stehen gelassen, damit die RBC absinken konnten und die Agglutination deutlich erkennbar war.

Tabelle 10: Auflistung der Enzyme, mit denen die RBC, die im Agglutinations-Assay getestet wurden, behandelt wurden.

Enzym 1	Enzym 2
Pronase	-
Trypsin	-
Proteinase K	-
Neuraminidase	-
Neuraminidase	Pronase
Neuraminidase	Trypsin
Neuraminidase	Proteinase K
Pronase	Neuraminidase
Trypsin	Neuraminidase
Proteinase K	Neuraminidase

3.28 Kultivierung von HEK293

HEK293-Zellen sind semi-adhärenente humane embryonale Nierenzellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in *Cell*⁺-beschichteten Kulturflaschen (Sarstedt) bei 37 °C in einem Inkubator, der mit 5% CO₂ begast wurde. Als Zellkulturmedium wurde *Advanced DMEM-Medium* (Gibco) verwendet, dem 4 % FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin hinzugefügt wurden. Die Zellen wurden alle 2-4 Tage passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL) abgelöst und vereinzelt. Die Reaktion wurde mit Zellkulturmedium gestoppt, die Zellsuspension sedimentiert (5 Minuten, 900 rpm) und ein Teil der Zellen nach wiederholtem Waschen mit Medium neu ausgesät.

3.29 Transiente Transfektion von HEK293

Klonierung der eukaryontischen Expressionsvektoren

Für die Klonierung des Vektors für die eukaryontische Expression von Pf15 als GFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen wurde der Vektor pcDNA3.1(+)-mTACE-GFP verwendet. Pf15 wurde ohne Stoppcodon mit den *Primern* Pf15_KpnI-F1 und Pf15_BamHI_R2 amplifiziert. Die Primer enthielten die Restriktionsschnittstellen KpnI und BamHI, über die das Amplifikat nach Restriktion in den ebenfalls geschnittenen Vektor ligiert wurde.

Da der Il6-Rezeptor hinter seiner Signalsequenz (Il6R-SS) keine natürliche Restriktionsschnittstelle hatte, die für die Fusion der Il6R-SS an Pf15 ohne intrinsisches

Signalpeptid (Pf15oSP) geeignet gewesen wäre, wurde sie mittels PCR in den Vektor eingebracht (Abbildung 13). Hierfür wurde ein Teil der Vektorsequenz und der codierende Bereich für die IL6R-SS mittels PCR amplifiziert. Der *Forward-Primer* wurde so gewählt, dass er die Restriktionsschnittstelle PflMI enthielt (pcDNA3.1-IL6R-PflMI-F1) und dem *Reverse-Primer* wurde die Erkennungssequenz für BlnI angefügt (pcDNA3.1-IL6R-BlnI-R2). Pf15oSP wurde mit den *Primern* Pf15_BlnI_F1 und Pf15_BamHI_R2 amplifiziert. Die beiden Amplifikate wurden mit BlnI geschnitten und miteinander ligiert. Es folgte eine Fusions-PCR mit den beiden äußeren *Primern* pcDNA3.1-IL6R-PflMI-F1 und Pf15_BamHI_R2. Das Amplifikat wurde dann mit den Enzymen PflMI und BamHI geschnitten und in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor ligiert.

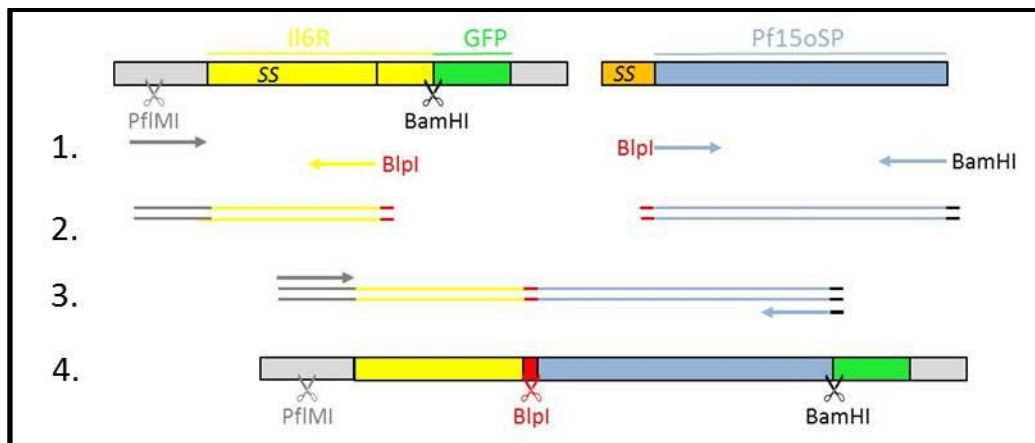


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Fusion von IL6R-SS und Pf15oSP in den Vektor pcDNA3.1(+)-GFP. 1. Amplifikation der Zielsequenzen des IL6R enthaltenden Vektors pcDNA3.1(+)-IL6R-GFP und Pf15oSP mittels PCR. 2. Restriktion der PCR-Produkte mit BlnI und Ligation mit T4-Ligase. 3. Fusions-PCR mit den außen liegenden Primern. 4. Restriktion des Fusions-PCR-Produktes und des Vektors pcDNA3.1(+)-IL6R-GFP mit PflMI und BamHI und Ligation. Der finale Vektor enthält die Signalsequenz (SS) enthaltenden N-Terminus des IL6R, der über die BlnI-Schnittstelle mit Pf15oSP fusioniert wurde. Primer sind als Pfeile abgebildet. Sequenzen des Vektors sind grau, des IL6R gelb, des GFP grün, von Pf15oSP blau und die eingefügte Restriktionsschnittstelle BlnI ist rot gefärbt.

Durchführung der Transfektion

Die transiente Transfektion erfolgte in *Cell⁺*-beschichteten 12-well Platten, in die runde Deckgläschen gelegt wurden. Die Deckgläschen wurden zuvor in 70 % EtOH getaucht und dann mehrmals durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen. Es wurden pro Vertiefung

200000 Zellen in 1 ml Zellkulturmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit Hilfe von TurboFect™ *in vitro* Transfektions-Reagenz. Es wurden 1 µg DNA mit 2 µl TurboFect™ in einem Gesamtvolumen von 100 µl in serumfreien Zellkulturmedium für 15-20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch tropfenweise zu den Zellen hinzugefügt. Nach weiteren 24 h wurde die Expression der GFP-Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch überprüft und dokumentiert.

3.30 Erythrocyten-Bindungs-Assay mit transfizierten HEK293-Zellen

Der Erythrocyten-Bindungs-Assay wurde mit adhärenenten HEK293-Zellen durchgeführt, die mit Vektoren für die Überexpression von Pf15-GFP oder IL6R-Pf15-GFP-Fusionsproteinen transfiziert wurden. 24 h nach der Transfektion wurde als erstes die Expression der GFP-Protein mikroskopisch überprüft.

-Version 1: Anschließend wurden zu den HEK293-Zellen 100 µl einer 10 %igen Erythrocytenlösung hinzugefügt. Nach 2 h wurden die adhärenenten Zellen drei Mal vorsichtig mit PBS gewaschen und die HEK293-Zellen unter dem Mikroskop betrachtet.

-Version 2: Die auf Deckgläschen wachsenden Zellen wurden mit der Zellseite nach unten mit einem Tropfen PBS auf einen Objektträger gelegt. Auf eine Seite des Deckgläschens wurde ein Tropfen der 10 %igen RBC-Suspension platziert. Durch Absaugen des PBS mit einem Zelltuch auf der gegenüberliegenden Seite wurde ein Flüssigkeitsstrom hervorgerufen, der die Erythrocyten unter das Deckgläschen sog. Die adhärenenten HEK293-Zellen und die vorbeiströmenden RBC wurden mikroskopisch verfolgt.

4 Ergebnisse

4.1 Massenspektrometrische Identifikation der zu untersuchenden Proteine in Merozoiten

Nachdem die zu untersuchenden Proteine mit Hilfe von konventionellen Proteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese (IEF/SDS) und 2D-16-BAC-SDS-PAGE mit anschließender massenspektrometrischer Analyse nicht identifiziert wurden (Daten nicht gezeigt), wurden die Merozoitenmembranproteine in SDS-Probenpuffer gelöst und nach 1D-SDS-PAGE mittels nano-LC-ESI-MS identifiziert. Hierfür wurden Merozoiten angereichert (Abbildung 14) und lysiert. Die Merozoitenmembranen wurden isoliert und mit Hochsalz- und Karbonatpuffer gewaschen, um lösliche und peripher assoziierte Proteine zu entfernen.

Die löslichen und peripher assoziierten Proteine der Überstände wurden präzipitiert und die Proteine der Membranen wurden in SDS-Probenpuffer gelöst. Die zu untersuchenden Proteine wurden zum einen immunologisch mittels Western Transfer nachgewiesen und zum anderen massenspektrometrisch am Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung für Systematische Proteomforschung in der AG Tholey von Dr. T. Overath analysiert.

In Giemsa-gefärbten Ausstrichen wurde die Qualität der verwendeten Merozoiten überprüft (Abbildung 14A). Durch die Zugabe von EGTA wurden die Merozoiten daran gehindert in die RBC einzudringen und wurden mittels differentieller Zentrifugation angereichert. Allerdings waren auch sehr vereinzelt Erythrocyten sichtbar. Intakte infizierte RBC waren nicht sichtbar. Der Nachweis der zu untersuchenden Proteine mittels Western Blot (Abbildung 14C) bestätigte, dass es sich bei den zu untersuchenden Proteinen um Membranproteine handelte. Sie waren alle deutlich in der Membranfraktion nachweisbar, jedoch nicht in den präzipitierten Proteinen des Überstandes.

In den Proteinbanden 1, 2, 3, 4, 8, 9, 15, 16 und 17 (Abbildung 14 D) wurden insgesamt 466 Proteine identifiziert. Die Proteine galten als identifiziert, wenn mindestens zwei Peptide mit hoher Wahrscheinlichkeit ($p \leq 0,01$), oder wenn mindestens drei Peptide mit mäßiger Wahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$) dem Protein zugeordnet wurden. Bei der Erstellung der Datenbank für die Datenbanksuche wurden nur Proteine aus *Plasmodium falciparum* verwendet, humane und bovine Proteine wurden nicht berücksichtigt. Nach Abzug der Mehrfachidentifikationen blieben noch 395 von den 466 Proteinen für die Auswertung der massenspektrometrischen Analyse. Diese ergab, dass drei Viertel der identifizierten Banden

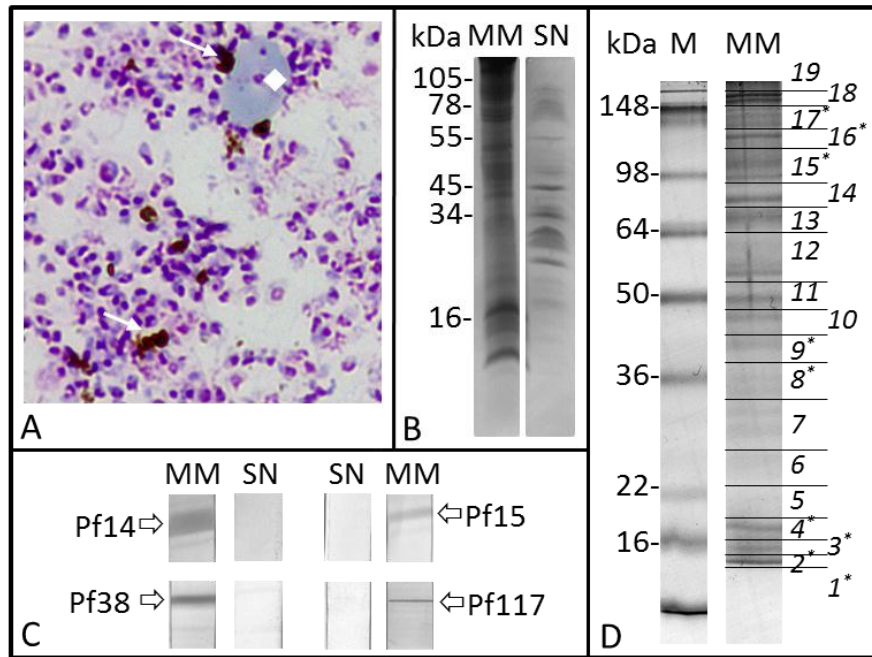


Abbildung 14: Probenmaterial für die massenspektrometrische Identifikation von Proteinen aus Merozoiten. (A) Giemsa-gefärbter Ausstrich isolierter Merozoiten. Es befinden sich noch die Hämozoinkristalle (Pfeil) und vereinzelt Erythrocyten (◇) in der Präparation. (B) 1D-SDS-Gel der Proben für den immunologischen Nachweis der Zielproteine in den Merozoitenmembranen (MM) und dem Proteinüberstand (SN) bestehend aus präzipitierten löslichen und peripher assoziierten Proteinen. (C) Immunologischer Nachweis der Zielproteine nach Western Transfer. (D) 1D-SDS-Gel der Merozoitenmembranpräparation (MM) für die Massenspektrometrie, Coomassie-gefärbt. Die Banden des SDS-Gels wurden in Stücke geschnitten und nummeriert (*kursiv*). Die massenspektrometrisch analysierten Proteinbanden sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Der Protein-Größenstandard (M) ist links in kDa angegeben.

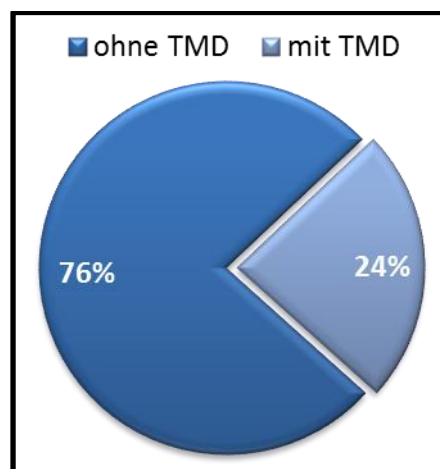


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der massenspektrometrisch identifizierten Proteine mit bzw. ohne vorhergesagte Transmembrandomäne. Die Proteine aus ausgesuchten Banden eines SDS-Gels einer Merozoitenmembranpräparation wurden massenspektrometrisch mittels nanoLC-ESI-MS analysiert.

keine vorhergesagte Transmembrandomäne hatten (Abbildung 15). Die Einteilung der Proteine hinsichtlich ihrer Funktion bzw. Lokalisation erfolgte anhand der Datenbankeinträge und mit Hilfe der Annotationen bei PlasmoDB (Abbildung 16A). Insgesamt 83 % der Proteine wurden zugeordnet, wohingegen die Funktion bzw. Lokalisation von 17 % der Proteine nicht charakterisiert war. 69 % der klassifizierten Proteine waren sicher annotiert, wohingegen 31 % wahrscheinlich aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen nur einer mutmaßlichen Funktion zugeordnet wurden (Abbildung 16B). Sie enthielten in ihrer Bezeichnung den Zusatz „*putative*“. Die identifizierten Proteine wurden verschiedenen zellulären Bereichen zugewiesen. Mit 28 % waren die Proteine für Replikation, Transkription und Translation am häufigsten vertreten, darunter vor allem verschiedene Untereinheiten der ribosomalen Proteine, DNA- und RNA-Polymerasen, sowie DNA- und RNA-bindende Proteine, wie Histone und Transkriptions-Faktoren.

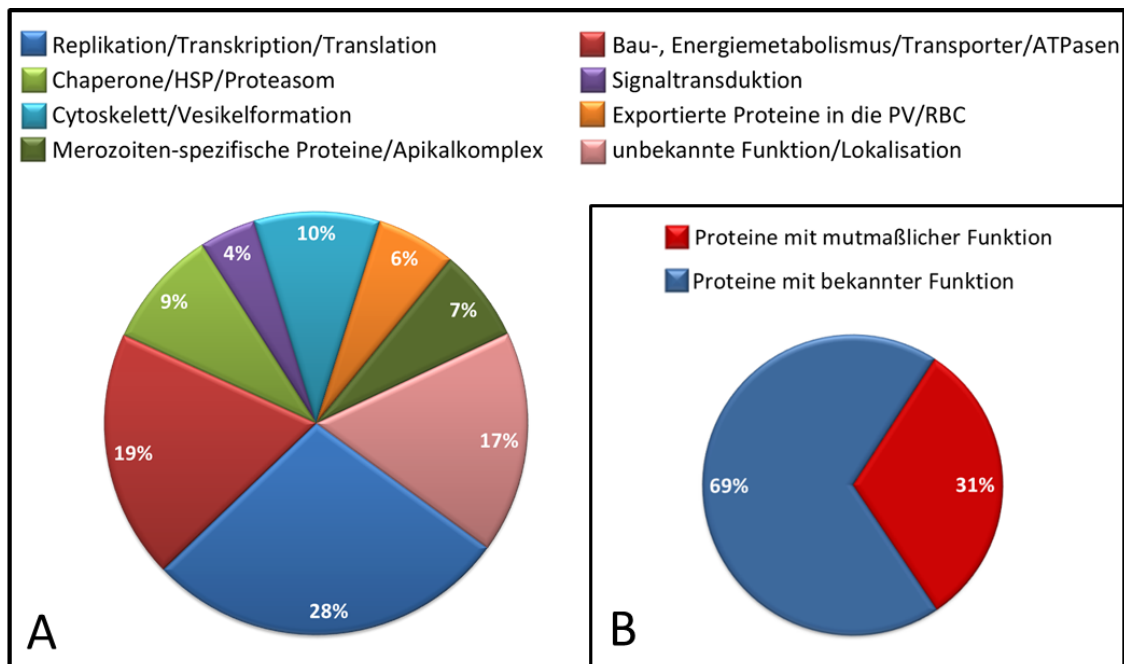


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine aus ausgesuchten Banden einer SDS-PAGE mit Proteinen einer Merozoitenmembranpräparation. (A) Die Proteine wurden entsprechend ihrer Funktion bzw. Lokalisation eingeteilt. **(B)** 31% der Proteine, deren Funktion bzw. Lokalisation bekannt war, waren mutmaßlich einer Funktion zugeordnet. Sie enthielten im Gegensatz zu den bekannten Proteinen in der Datenbank den Vermerk *putative*.

Am zweithäufigsten waren Proteine, die im Bau- und Energiestoffwechsel, sowie im Hämoglobinabbau und als Transportproteine eine Rolle spielen. Dazu gehörten Enzyme der Glycolyse, wie z.B. die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, der Nahrungsvakuole, wie Falcipain-2 und Plasmepsin (Shenai *et al.*, 2000, Moura *et al.*, 2009) und der *Multidrug Resistance*-Transporter Mdr-1 (Duraisingh und Cowman, 2005). Neben Cytoskelett-Elementen, wie Actin-1, Myosin A und Dynamin-ähnlichen Proteinen, wurde auch eine Reihe von Proteinen identifiziert, die für die Bildung und Fusion von Vesikeln wichtig sind. Darunter befinden sich verschiedene *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment* (SNARE)-Proteine und Coatomer-Proteine. 9 % der identifizierten Proteine waren Chaperone, *Heat Shock*-Proteine (HSP) und Proteasom-Untereinheiten, sowie Bestandteile des Ubiquitin-Systems. Proteine der Signaltransduktion, darunter vor allem Kinasen, wurden zu 4 % identifiziert. Obwohl für die massenspektrometrische Analyse Merozoiten isoliert wurden, wurden auch Proteine identifiziert, von denen bekannt ist, dass sie in die PV oder die Wirtszelle exportiert werden. *Knob*-assoziierte Proteine, wie das *Knob-Associated Histidine Rich Protein* (KAHRP), oder Mitglieder der *Early Transcribed Membrane Protein* (ETRAPM)-Familie, die an der PVM lokalisiert sind, wurden identifiziert (Spielmann *et al.*, 2003, Marti *et al.*, 2004).

Lediglich 7% der Proteine waren stadienspezifisch für Merozoiten, darunter auch die in dieser Arbeit untersuchten Proteine Pf14, Pf15 und Pf117 (Abbildung 17). Weitere bekannte Proteine der Merozoitenplasmamembran waren MSP-1, -7, und -9 (Gaur *et al.*, 2004). Es wurden auch einige Proteine des Apikalkomplexes identifiziert, darunter vor allem Rhoprienproteine, wie RhopH-1, -2, und -3 und auch RAP-1, -2 und -3 (Kaneko, 2007). Es wurde auch ein GPI-verankertes Micronemen-Protein (Bezeichnung in der PlasmoDB) identifiziert, das bis dato aber nicht näher charakterisiert wurde.

Die zusätzlich identifizierten Proteine machten deutlich, dass es sich bei den aufgetrennten Proteinen nicht nur um Merozoitenmembranproteine handelte, sondern es wurden auch Proteine der PVM, wie z.B. EXP-1 und EXP-2, identifiziert, was bedeutet, dass auch PVM-Fragmente in der Merozoitenpräparation vorlagen, die lichtmikroskopisch durch die Giemsa-Färbung nicht sichtbar waren. Es wurden außerdem eine Reihe löslicher Proteine identifiziert, die deutlich machen, dass die Behandlung mit Hochsalz- und Karbonatpuffer nicht ausreichend war, um alle löslichen und membran-assoziierten Proteine zu entfernen.

MGSQIQPSRFLDSAILALFAMIISASFLYMFSEFFMMSHESK L FNNKLSMIL SRLFPFKKTFEYNLTHILLTICIIILSLKPDSVSSKYGLKDSRKPQKDDA HKGDEDPNRLNRDKKK	A
MLGLIFKVVIFIVGYVLPIGLSLHGWNKK YEMIEYLYK YVYFFVIFENLVT PSLGRVIYRISSFLWCILHLTIYIILITPK LNYLNSIYDKISKINNOQNI YWNKYLVNPLNDKFNKIVKLLKTL	B
MKLYHLFFLIIFIQDILCLKYEDYIKSLPEAFHLAKGDSKKDEMCKENPKE ENDNNNDKSNNSNNNYK VGMQDIVNNISNK ISDDNKNKDNNSDKYDCND DDNNNTSNL FHKMMCAFKK L FKNEQVIEKDIRNVKKGVINLKENIVKDS NISKHTNILKDDITKNTNYL FNLFKKSFKEEGDNVNFSSDYFNKLNLPDS HLFFSK LLLTL SQNDDKDKNKITHINNYNNKMNDNTENNTLLQNFLSFIK NFKQKDEYNNNDNKKENDFFHSFYLHNENDKHNNKDKKYSWWFTNKNDK KNVDNLLNLLYNSNSNFNSTFNQNTDHENLPEQVREKKSQEEK WLDI FWKYFHKEEEIEK KEMNEKNDLNDNNKNGVNVDDHNLNGLHNLDDKKNKFS FLNYWNDKDIPEKGSADAYSQDNNNKTDQNNDDNK FNIFMYFGK NKKND EDMNKKKEMNMDMNMKDMNKDMNMNMNMNMNMNMNMNMNMGGDTN VDSDTLNLLNKNEMNKVDDDPKGFVNLVKNYYENNKVNDINYSLLTS GKETNENINYHPLIKFKSCLMNCFKENNTEKSVEKESYLSFDDYKILEKCI SKCKNNLNDTHNEDPPMKDDTILYMEKKNINDTTKNNLLNDNINNLIN NNESTEKETSSKWSDFFKKNNKNIKDSYEEDKNSNPQDNISVLTNETN LENLILNDNLSTHLMYDINNKKNNISNNNNKKNISNNNNNY KMKNFLID SKFKYSNKEKTKNFIQDEQQDKNKVYNKPLHFFNYFNNSNINTDDNNNNN NNNNNIYKDNLIMNNSVNDNLLNDDKYNSL KINNNNNIIMLNK NDIDNDE NNNYISTGFLLITFFVYLSAFTNIINQFYLSFKEKICLFIKGYKGT DNVYEECESFLPKVQYKNSHNNNNNNNDNNNFCQSYENIYHSFQENSLD MA	C

Abbildung 17: In einer Merozoitenpräparation massenspektrometrisch identifizierte Proteinfragmente in (A) Pf14, (B) Pf15, (C) Pf17. Die Proteine galten als identifiziert, wenn mindestens zwei Peptide mit hoher Wahrscheinlichkeit ($p \leq 0,01$) oder wenn mindestens drei Peptide mit mäßiger Wahrscheinlichkeit ($p \leq 0,05$) dem Protein zugeordnet wurden. Für Pf14 wurde aufgrund seines kleinen Molekulargewichts eine Ausnahme gemacht. Hier wurden ein Peptid mit hoher und eines mit mäßiger Wahrscheinlichkeit als identifiziert gewertet. Die Primärstruktur der identifizierten Proteine ist im Einbuchstaben-Code und die identifizierten Peptide sind rot dargestellt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels nano-LC-ESI-MS.

4.2 Zeitlicher Verlauf der Synthese der nativen Proteine in *P. falciparum*

Der Nachweis der zu untersuchenden Proteine wurde mit Membranpräparationen infizierter Erythrocyten durchgeführt. Aus einer hochsynchronen Parasiten-Kultur wurden über einen Zeitraum von 48 h alle 12 h (Abbildung 18) gleich viele Zellen entnommen, deren Membranen isoliert wurden. Anhand von Western Blots wurde die stadienspezifische Expression der Zielproteine untersucht.

Während der Probenentnahme entwickelten sich die Parasiten erwartungsgemäß innerhalb von 48 h vom Ringstadium bis hin zum Schizonten. Da die Synchronität einer *P. falciparum*-Kultur *in vitro* begrenzt ist, befanden sich zu den unterschiedlichen

Zeitpunkten auch einige Parasiten in der Kultur, die schätzungsweise maximal 6 h früher bzw. 6 h später in ihrer Entwicklung waren als in Abbildung 18 abgebildet.

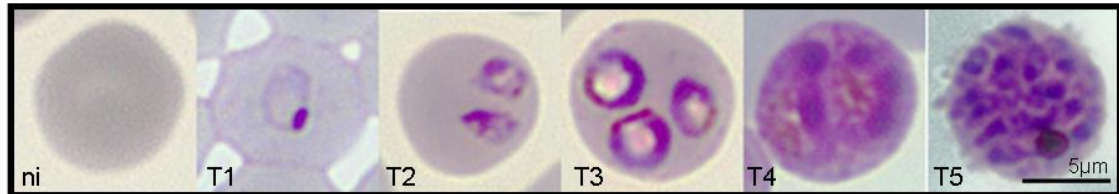


Abbildung 18: Giemsa-gefärbte Ausstriche der *P. falciparum*-Kultur zu den Entnahmezeitpunkten. **T1-T5:** die abgebildeten Stadien zeigen exemplarisch das Entwicklungsstadium in dem sich die Parasiten zum Zeitpunkt der Probenentnahme befanden. In Klammern ist der Entnahmezeitpunkt nach Synchronisation mit Sorbitol angegeben. **ni:** nicht infizierter Erythrocyt, **T1 (0 h):** Ringstadium, **T2 (12 h):** späte Ringe/frühe Trophozoiten (doppelt infiziert), **T3 (24 h):** Trophozoiten (dreifach infiziert), **T4 (36 h):** früher Schizont (doppelt infiziert), **T5 (48 h):** später Schizont.

Anhand der Western Blots lässt sich eindeutig nachweisen, dass die zu untersuchenden Proteine im Laufe des erythrocytären Zyklusses vermehrt synthetisiert werden und die maximale Anreicherung im Schizontenstadium erreicht wird (Abbildung 19). Die Proteine unterschieden sich jedoch in ihrer Nachweisbarkeit in den unterschiedlichen Stadien. Pf14 wurde bereits in den Ringstadien stark exprimiert und war bis hin zum Schizontenstadium gut nachweisbar (Abbildung 19A). Pf38 und Pf117 hingegen wurden in Ringen und Trophozoiten gar nicht nachgewiesen. Erst in Schizonten (Abbildung 19B und C, Spuren T4 und T5) waren beide Proteine deutlich sichtbar. Pf15 wurde durch das Serum SABT5052 nur schwach in Trophozoiten nachgewiesen (Abbildung 19D). Dies nahm mit zunehmender Reife der verwendeten Parasiten zu, so dass eine vermehrte Synthese und Akkumulation des Proteins in den Parasiten angenommen wurde.

Trotz Vorinkubation der Antiseren mit Erythrocytenextrakt kam es zu einer Kreuzreaktion der Antikörper mit den Proben aus nicht infizierten Erythrocyten während des immunologischen Nachweises (Abbildung 19A-D, Spur ni). Da das Antiserum gegen Pf15 im Bereich der 17 kDa Markerbande drei für Pf15 in Frage kommende Banden aufwies, wurden dieselben Proben auch mit spezifisch gereinigten Antikörpern gegen den N- und C-Terminus von Pf15 nachgewiesen (Abbildung 19E und F). Die mittlere der drei Banden war nicht mehr sichtbar. Des Weiteren zeigten diese Western Blots, dass die spezifische Reinigung der anti-23-Pf15- und der anti-24-Pf15-IgG die Kreuzreaktion zwar reduzierte jedoch nicht vollständig beseitigte.

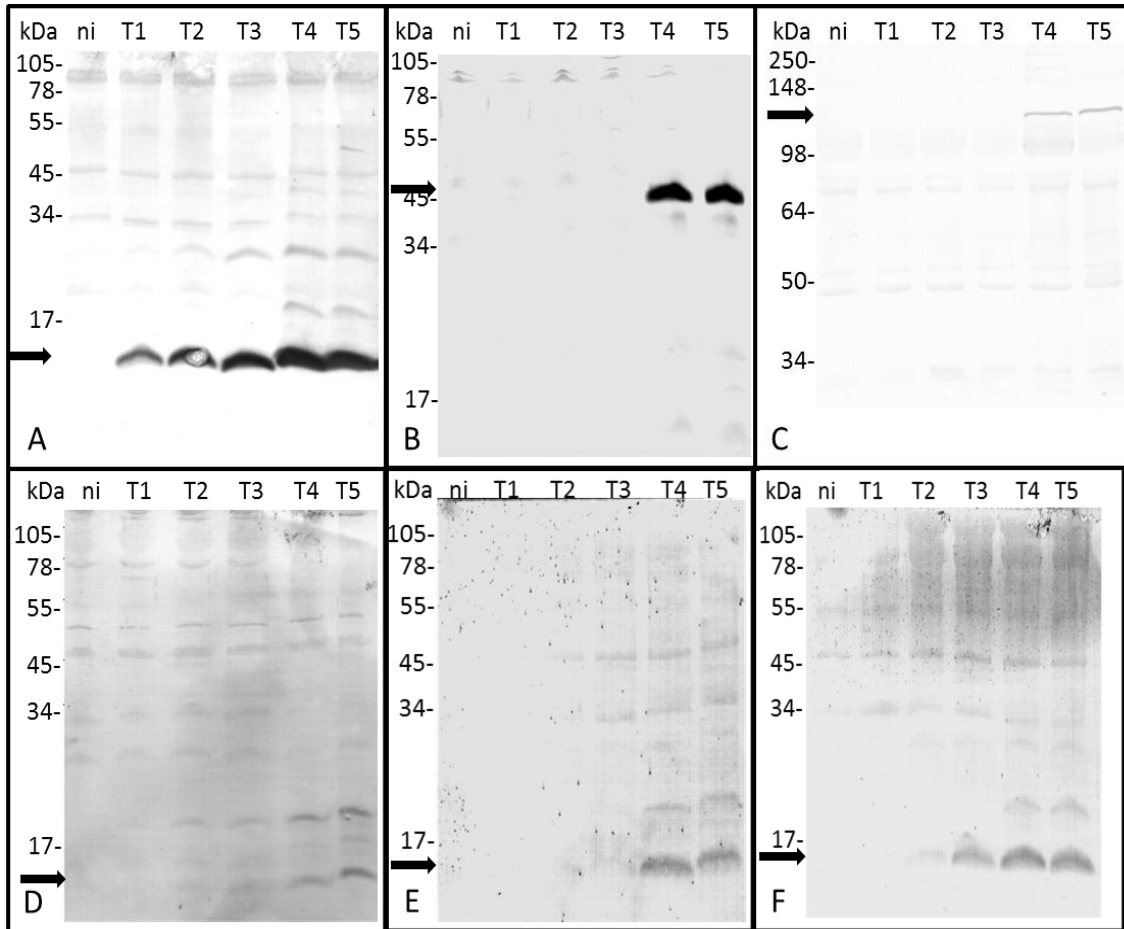


Abbildung 19: Stadienspezifischer Nachweis der Zielproteine während der erythrocytären Entwicklung. Während eines erythrocytären Zyklus wurden alle 12 h Proben aus einer synchronen Parasiten-Kultur entnommen und mittels immunologischem Nachweis nach Western Transfer analysiert. Nachweis von **(A)** Pf14 mit SABT5066, **(B)** Pf38 mit SABT5062, **(C)** Pf117 mit SABT5060, **(D-E)** Pf15 mit **(D)** Serum SABT5052 und den spezifisch gereinigten Antikörpern **(E)** anti-23-Pf15 und **(F)** anti-24-Pf15. Alle Antikörper, bis auf die spezifisch gereinigten Antikörper anti-23-Pf15 und anti-24-Pf15, wurden mit Erythrocytenextrakt vorinkubiert.

4.3 Zelluläre Lokalisation

Die Proteine Pf14, Pf15 und Pf117 sind in der Plasmamembran von Merozoiten lokalisiert (Abbildungen 20, 21, 23). Die Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen weisen in Schizonten das für Merozoitenoberflächenmoleküle typische Waben-förmige Muster auf. Pf38 ist immunfluoreszenzmikroskopisch in den Rhoptrien nachgewiesen worden (Abbildung 22). In Schizonten und Merozoiten ist das Rhoptrien-typische Doppelpunkt-Signal allerdings schwer zu erkennen. In Schizonten wurde nur selten der Doppelpunkt an intrazellulären Merozoiten sichtbar. Häufig liegen die Merozoiten

wahrscheinlich so, dass die Rhoptrien gar nicht oder nur einer von beiden sichtbar ist. Dasselbe gilt für freie Merozoiten. Neben der punktuellen Verteilung war außerdem zu sehen, dass sich das Fluoreszenzsignal vom apikalen Pol ausgehend ein Stück weit über die Merozoitenplasmamembran erstreckt. Dieses Signal ist nur sehr schwach, deutet aber auch darauf hin, dass Pf38 zum Teil auch auf der Oberfläche lokalisiert sein könnte.

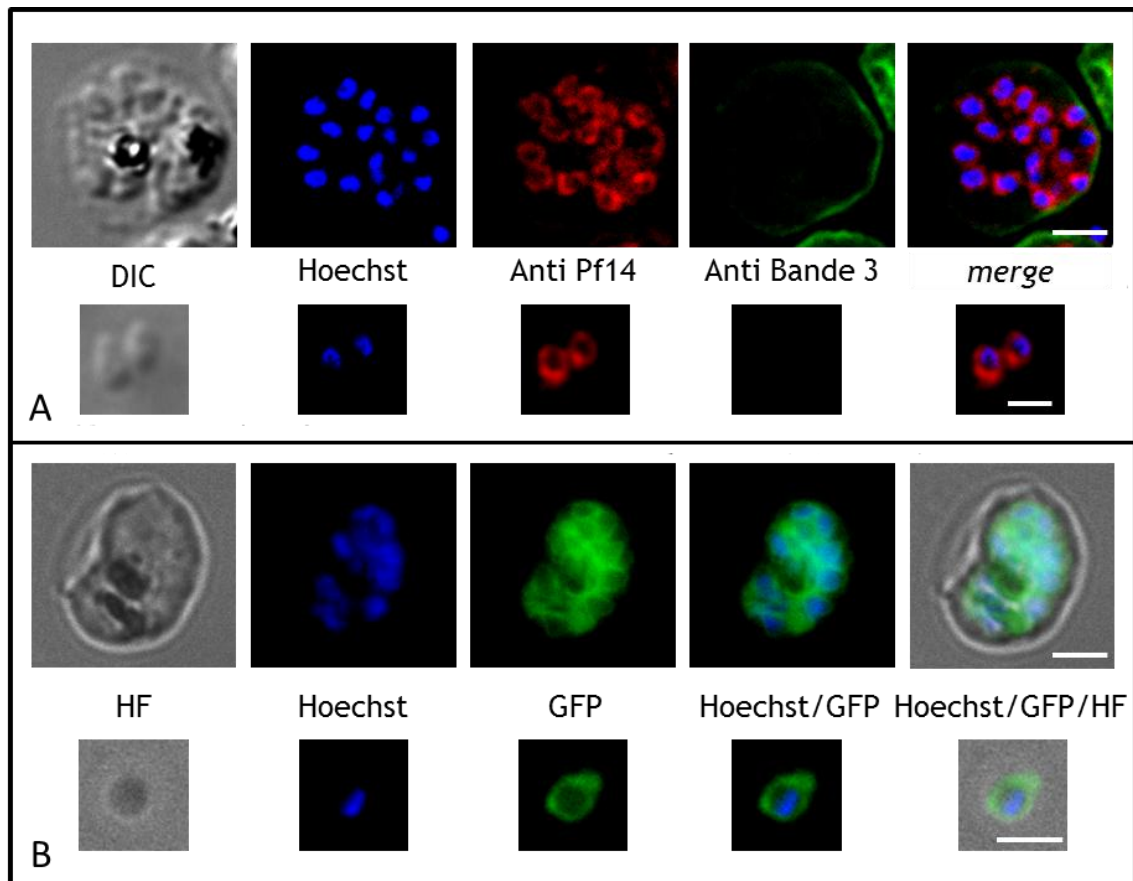


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Pf14 in der Merozoitenplasmamembran. (A) Immunfluoreszenzmikroskopie. Pf14 wurde in fixierten Schizonten (obere Reihe) und freien Merozoiten (untere Reihe) nachgewiesen und in der Plasmamembran lokalisiert. **DIC** *Differential Interference Contrast*, **Hoechst** Kernfärbung mit Hoechst 33258, **Anti Pf14** Nachweis von Pf14 in der Merozoitenmembran mit SABT5066 und Anti-Kaninchen IgG-DyLight549-Antikörpern, **Anti Bande 3** Nachweis von Bande-3 in der Erythrocytenmembran mit Maus-anti Bande-3-IgG und Anti-Maus IgG-DyLight488-Antikörpern, **merge** Überlagerung der Fluoreszenzkanäle. **(B) Lokalisation von Pf14-GFP-Fusionsproteinen in der Plasmamembran lebender transgener Parasiten.** **HF** Hellfeld, **GFP** GFP-Fluoreszenz. Der Maßstabsbalken entspricht ca. 2 μm .

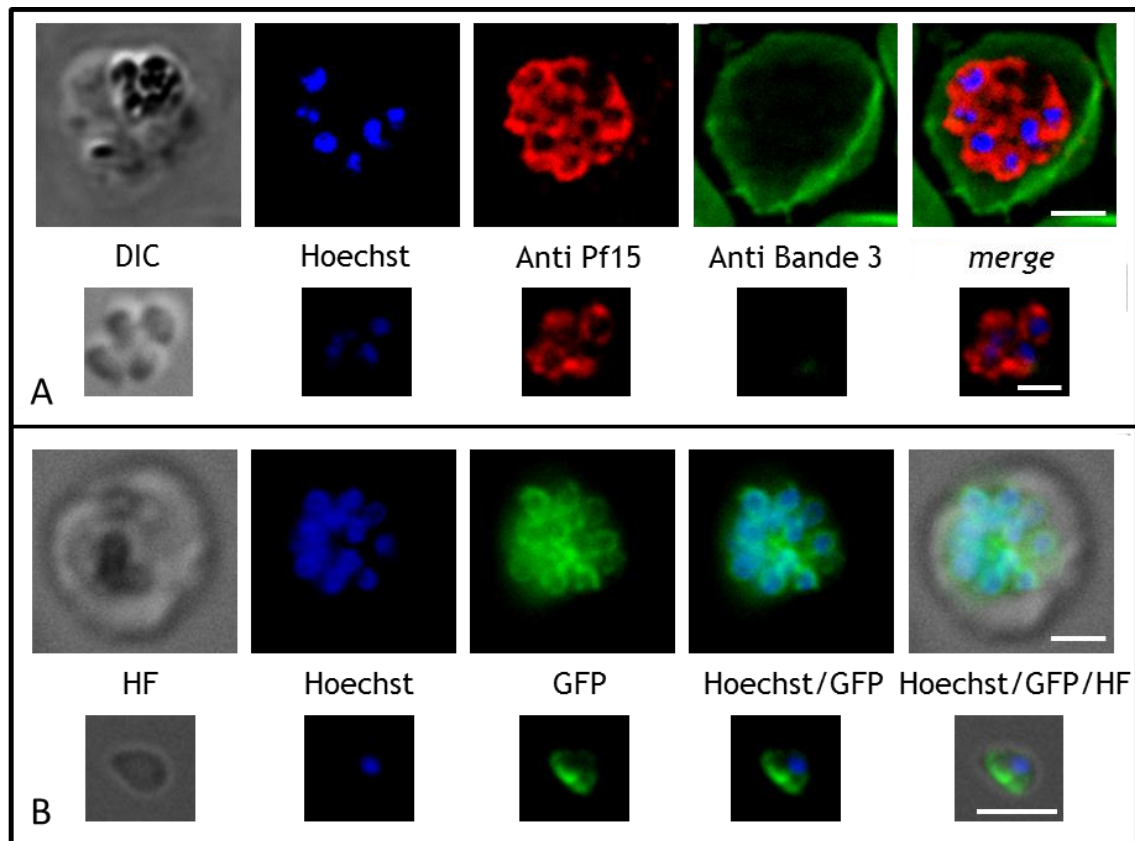


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Pf15 in der Merozoitenplasmamembran. (A) **Immunfluoreszenzmikroskopie.** Pf15 wurde in fixierten Schizonten (obere Reihe) und freien Merozoiten (untere Reihe) nachgewiesen und in der Plasmamembran lokalisiert. **DIC** *Differential Interference Contrast*, **Hoechst** Kernfärbung mit Hoechst 33258, **Anti Pf15** Nachweis von Pf15 in der Merozoitenmembran mit SABT5052 und Anti-Kaninchen IgG-DyLight549-Antikörpern, **Anti Bande 3** Nachweis von Bande-3 in der Erythrocytenmembran mit Maus-anti Bande-3-IgG und Anti-Maus IgG-DyLight488-Antikörpern, **merge** Überlagerung der Fluoreszenzkanäle. (B) **Lokalisation von Pf15-GFP-Fusionsproteinen in der Plasmamembran lebender transgener Parasiten.** **HF** Hellfeld, **GFP** GFP-Fluoreszenz. Der Maßstabsbalken entspricht ca. 2 μm .

Zur Lokalisation wurden außerdem transgene Parasiten hergestellt, die die zu untersuchenden Proteine als GFP-Reporterproteine exprimieren sollten. Die GFP-Fluoreszenz war nur in den 3D7-Linien für Pf14-GFP und Pf15-GFP gut sichtbar und dokumentierbar. Beide bestätigten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie und wiesen in Schizonten wabenartige Muster auf. Die Merozoiten waren grün umrandet. Auch die Pf38-GFP-Parasitenlinie fluoreszierte schwach. Allerdings war das Signal so schwach, dass es mit der Mikroskop-Kamera nicht dokumentierbar war. Die

GFP-Reporterlinie für Pf117 fluoreszierte überhaupt nicht. Auch mit erhöhten Konzentrationen der Selektionsdroge wurde kein GFP-Signal mikroskopisch gesehen.

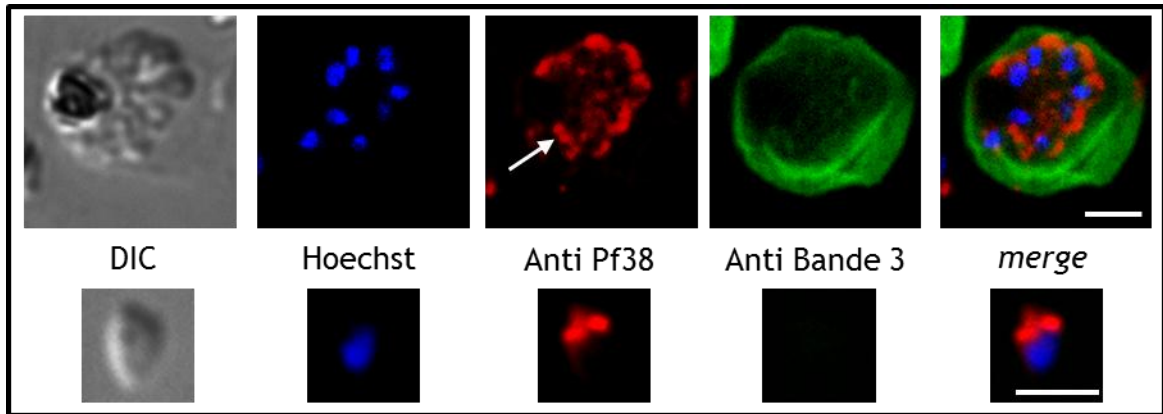


Abbildung 22: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Pf38 in den Rhoptrien. Pf38 wurde in fixierten Schizonten (obere Reihe) und freien Merozoiten (untere Reihe) nachgewiesen. Der Pfeil zeigt in Schizonten den Rhoptrien-typischen Doppelpunkt. **DIC** *Differential Interference Contrast*, **Hoechst** Kernfärbung mit Hoechst 33258, **Anti Pf38** Nachweis von Pf38 in den Rhoptrien und partiell auf der Merozoitenoberfläche mit SABT5062 und Anti-Kaninchen IgG-DyLight549-Antikörpern, **Anti Bande 3** Nachweis von Bande-3 in der Erythrocytenmembran mit Maus-anti Bande-3-IgG und Anti-Maus IgG-DyLight488-Antikörpern, **merge** Überlagerung der Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken entspricht ca. 2 μm .

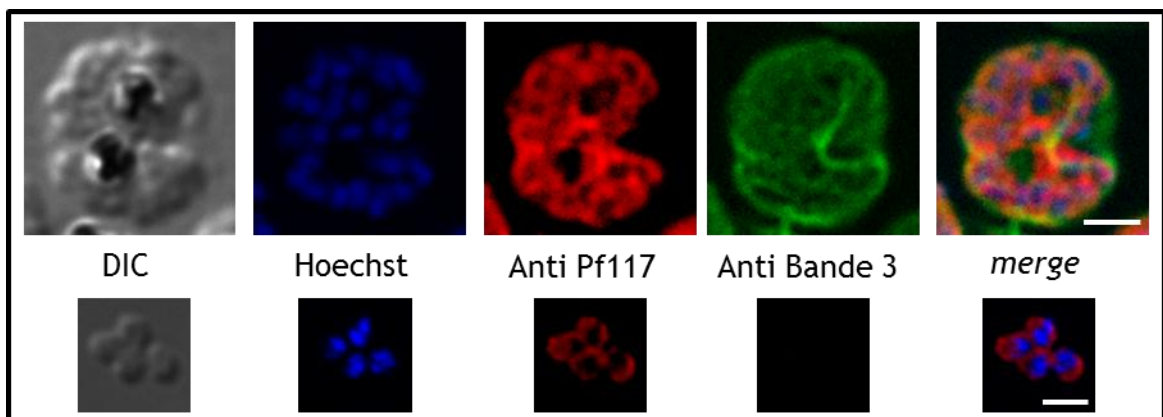


Abbildung 23: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Pf117. Pf117 wurde in fixierten Schizonten (obere Reihe) und freien Merozoiten (untere Reihe) nachgewiesen und in der Plasmamembran lokalisiert. **DIC** *Differential Interference Contrast*, **Hoechst** Kernfärbung mit Hoechst 33258, **Anti Pf117** Nachweis von Pf117 in der Merozoitenmembran mit SABT5060 und Anti-Kaninchen IgG-DyLight549-Antikörpern, **Anti Bande 3** Nachweis von Bande-3 in der Erythrocytenmembran mit Maus-anti Bande-3-IgG und Anti-Maus IgG-DyLight488-Antikörpern, **merge** Überlagerung der Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken entspricht ca. 2 μm .

4.4 Viabilitäts-Assays

Antikörper haben während der erythrocytären Entwicklung Zugang zu den intrazellulären Parasiten und können dort hemmend auf das Überleben, die Entwicklung und auf die Freisetzung der Parasiten aus den Wirtszellen wirken (Bergmann-Leitner, 2009). Trotz hoher Konzentrationen an Antikörpern, hatte keines der Antiseren einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum und die Entwicklung der intraerythrocytären Parasiten (Abbildung 24). Das Gegenteil war der Fall. Je mehr Antikörper zu der *P. falciparum*-Kultur hinzugefügt wurden, desto besser wuchsen die Parasiten. Der Viabilitäts-Assay zeigt eine deutliche Erhöhung (Viabilität >1) der Messwerte im Vergleich zur Kontrolle ohne Antikörper. Auch morphologisch waren keine Veränderungen während der Inkubation der Parasiten mit den Antikörpern zu beobachten. Es kam auch nicht zu einer Verzögerung der Entwicklung.

4.5 Invasions-Assays

4.5.1 Invasionsinhibition durch Antikörper

Antikörper, die an Oberflächenmoleküle von Merozoiten binden, können die Invasion in die Erythrocyten inhibieren, indem sie die Protein-Protein-Interaktionen zwischen Parasit- und Wirtszelle blockieren. Die Invasions-Assays mit Protein A-gereinigten Antikörpern aus Kaninchenserum gegen die zu untersuchenden Proteine Pf14, Pf38 und Pf117 zeigten keine hemmende Wirkung auf die Invasion und entsprechen den Ergebnissen der Viabilitäts-Assays. Den Ergebnissen der Viabilitäts-Assays widersprechend zeigten die Antikörper gegen Pf15 signifikante Hemmung der Invasion um 40 % (2 mg/ml) bzw. 70 % (4 mg/ml) (Abbildung 25).

Die Wirkung der Antikörper gegen Pf15 ist Dosis-abhängig und die Invasion wurde bei einer Konzentration von 8 mg/ml Protein A-gereinigte IgG um 90 % gehemmt (Abbildung 26).

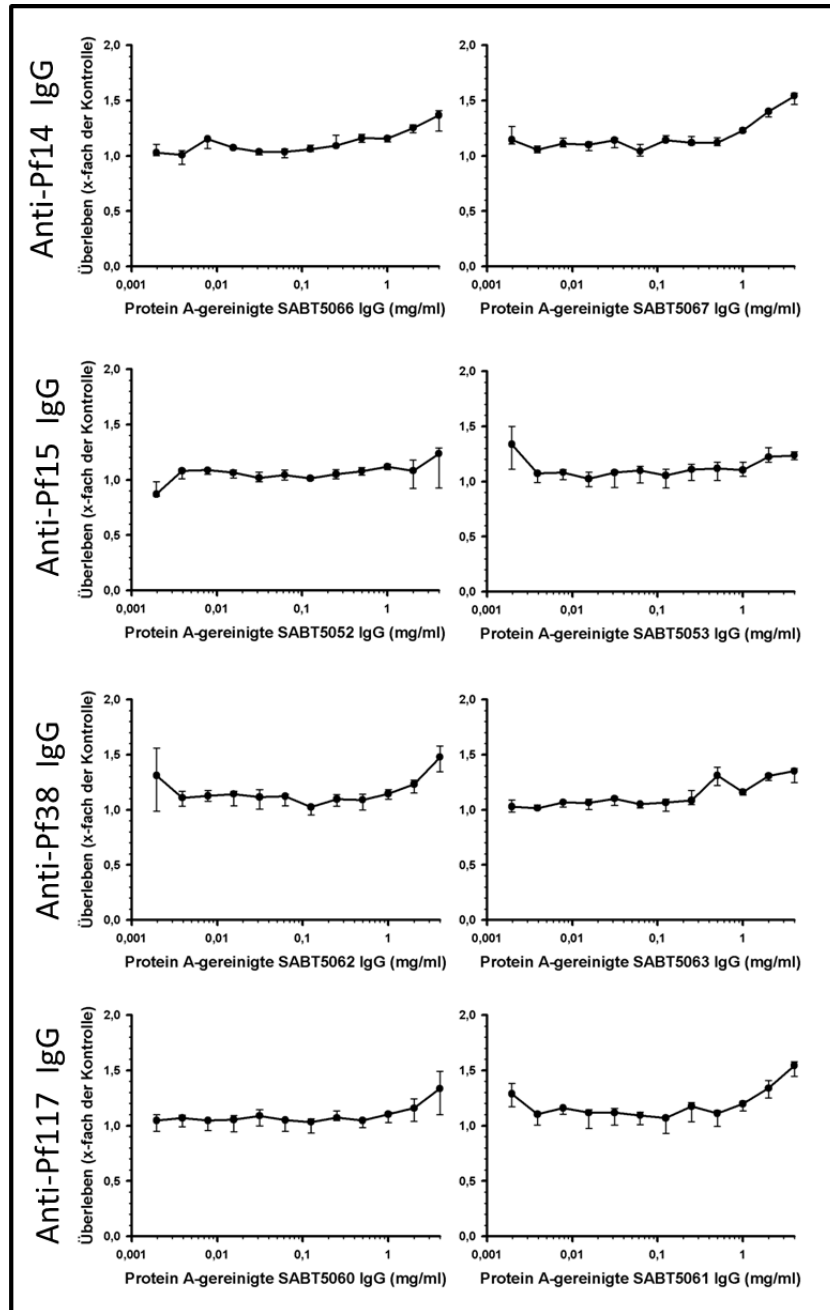


Abbildung 24: Dosis-abhängige Wirkung von Protein A-gereinigten Antikörpern gegen Pf14, Pf15, Pf38 und Pf117 im Viabilitäts-Assay mit *P. falciparum*. Die Zugabe von Protein A-gereinigten IgG zu 2% Trophozoiten zeigte nach 48 h *in vitro* keine inhibitorischen Effekte auf das Überleben und die Entwicklung der intrazellulären Parasiten, sondern führte in hohen Konzentrationen zu einer gesteigerten Vermehrung der Parasiten im Vergleich zur Kontrolle ohne zusätzliche IgG. Die Graphen zeigen Median und Abweichung einer vierfachen Bestimmung.

Da es sich bei den Protein A-gereinigten Antikörpern um ein Gemisch aus Antikörpern gegen die Immunisierungspeptide, gegen KLH, an das die Immunisierungspeptide gekoppelt waren, und aus im Kaninchen natürlich vorkommenden Antikörpern handelte,

wurden die Pf15-spezifischen Antikörper mit den Immunisierungspeptiden blockiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Invasionsinhibition durch Blockieren der Antikörper vollständig aufgehoben wurde (Abbildung 26, eingefügte Grafik). Außerdem wurde ausgeschlossen, dass bedingt durch die Zugabe hoher IgG-Konzentrationen die Hemmung durch osmotische Effekte verursacht wurde. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition ausschließlich durch die Pf15-spezifischen Antikörper herbeigeführt wurde. Die Antikörper gegen Pf15 wurden gegen die beiden Peptide 24 und 23 aus dem N- und C-Terminus des Proteins generiert. Um herauszufinden, welche Antikörper die Invasion inhibieren, wurden die Protein A-gereinigten IgG mit den Immunisierungspeptiden einzeln blockiert und ein Invasions-Assay durchgeführt. Dieser zeigte, dass durch die Blockierung mit Immunisierungspeptid 24 die Invasionsinhibition aufgehoben wurde, wohingegen die Blockierung mit Peptid 23 dies nicht tat (Abbildung 27A).

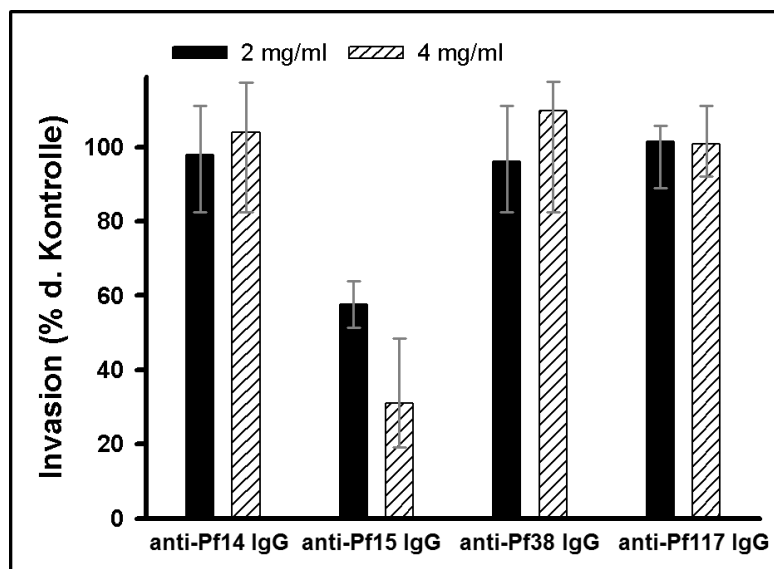


Abbildung 25: Invasions-Assays mit Antikörpern gegen Pf14, Pf15, Pf38 und Pf117. Die Tests wurden mit 2 mg/ml und 4 mg/ml Antikörpern durchgeführt, die aus den Kaninchenantisera Protein A-gereinigt wurden. Die Zugabe der gereinigten IgG zu Schizonten zeigte nach 24 h für anti-Pf14, -Pf38 und -Pf117 keine geringere Ring-Parasitämie als in den Kontrollen. Mit anti-Pf15-IgG war die Parasitämie deutlich erniedrigt. Dargestellt sind Median und Abweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmungen.

Dieses Ergebnis wurde zusätzlich bestätigt durch Invasions-Assays mit spezifisch gereinigten Antikörpern gegen Epitop 23 und 24, die in einer Konzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt wurden. Die Antikörper gegen den C-Terminus von Pf15 inhibierten

die Invasion nicht. Die Antikörper gegen den N-Terminus von Pf15 führten zu einer Invasionshemmung von ca. 25 % (Abbildung 27B). Die gegen den N-Terminus gerichteten Antikörper sind demnach Ursache der Hemmung der Invasion von Merozoiten in Erythrocyten.

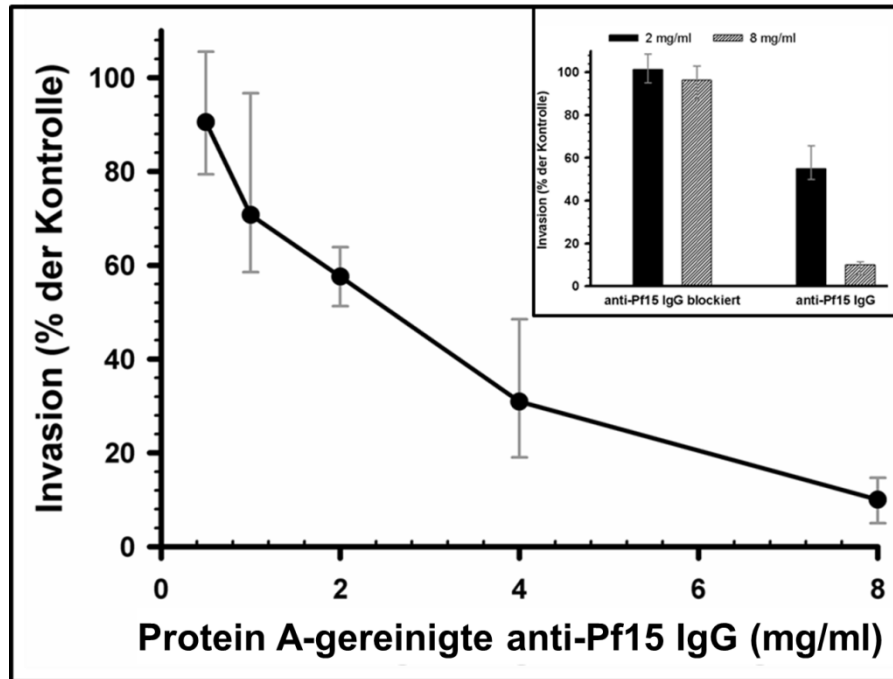


Abbildung 26: Invasionsinhibition durch Antikörper gegen Pf15. Die Wirkung der Protein A-gereinigten Antikörpern gegen Pf15 war Dosis-abhängig. Die eingefügte Grafik zeigt, dass die Inhibition durch Blockieren der Pf15-spezifischen Antikörper mit den beiden Pf15-Immunisierungspeptiden aufgehoben wurde. Dies belegt, dass nur die Pf15-spezifischen IgG und nicht die gegen KLH gerichteten Antikörper die Hemmung verursachen. Dargestellt sind Median und Abweichung von drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmungen.

4.5.2 Invasionsinhibition mittels rekombinantem Pf15N

Invasion kann nicht nur auf Seiten der Merozoiten mit Hilfe von Antikörpern blockiert werden, sondern auch auf Seiten der Erythrocyten mit Hilfe von Peptiden, die die Bindungsstellen für die Parasitenproteine blockieren. Da die Invasions-Assays mit Anti-Pf15-Antikörpern gezeigt haben, dass die IgG, die gegen den N-Terminus gerichtet sind, die Hemmung der Invasion verursachen, wurde der N-Terminus von Pf15, bezeichnet als Pf15N, rekombinant in Bakterien hergestellt und gereinigt. Das gereinigte Peptid wurde dann in Invasions-Assays mit *P. falciparum* eingesetzt.

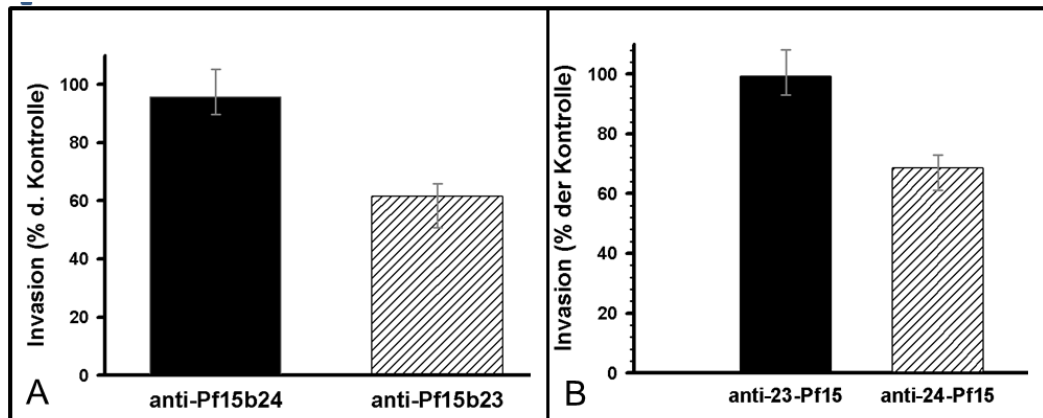


Abbildung 27: Reduktion der Invasion durch Antikörper gegen den N-Terminus von Pf15. (A) Ergebnis der Invasions-Assays mit Protein A-gereinigten IgG gegen Pf15, die mit Immunisierungspeptid EP053624 (anti-Pf15b24) und EP053623 (anti-Pf15b23) blockiert wurden. Die Antikörper wurden in drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmungen in einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt. (B) Reduktion der Invasion durch spezifisch gereinigte IgG gegen Epitop 23 (anti-23-Pf15) und 24 (anti-24-Pf15). Die eingesetzte Antikörperkonzentration betrug 0,5 mg/ml in zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmungen. Dargestellt sind Median und Abweichung.

4.5.2.1 Rekombinante Expression von Pf15N

Die Expression von Pf15N wurde in *E. coli trxB* durchgeführt. Das Protein wurde nach Induktion mit IPTG als GST-Fusionsprotein löslich exprimiert (Abbildung 28A, Spur 1 und 2) und wurde im ersten Schritt aus dem löslichen Bakterienextrakt über Glutathion Sepharose™ gereinigt (Abbildung 28A, Spur 3). Anschließend erfolgte die Abspaltung des GST-Anhangs mit Thrombin (Abbildung 28A, Spur 4). Das abgespaltene Pf15N hat einen theoretischen pI von 8,34, wohingegen der GST-Anhang einen theoretischen pI von 6,1 aufwies, so dass während der Anionenaustauschchromatografie mit einer Resource Q-Säule bei pH 8,0 das Peptid wie erwartet im Durchfluss zu finden war (Abbildung 28A, Spur 5). Pf15N wurde anschließend über eine SepPak angereichert, lyophilisiert und in kleinem Volumen resuspendiert. Nach der Reinigung wurde mit der Silberfärbung keine Verunreinigungen mehr nachgewiesen (Abbildung 28A, Spur 6).

Die Identität des gereinigten Pf15N wurde massenspektrometrisch durch Dr. Christoph Gelhaus, Zoologisches Institut, Zoophysiologie verifiziert.

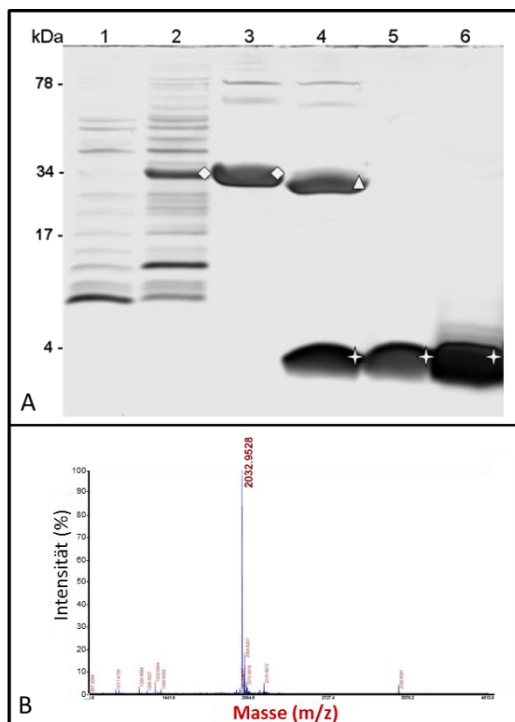


Abbildung 28: Rekombinante Expression und Reinigung von Pf15N. (A) SDS-Gel der Expression und Reinigung. 1 löslicher *E. coli*-Extrakt ohne Induktion, 2 löslicher *E. coli*-Extrakt nach 4 h Expression, 3 Eluat GS Trap, 4 Thrombin-Spaltung, 5 Durchfluss Resource Q, 6 Lyophilisiertes Eluat SepPak, ◆ GST-Pf15N-Fusionsprotein, ▲ durch Thrombin gespaltener GST-Anhang, ✦ Pf15N. (B) Massenspektrometrische Bestätigung der molekularen Identität. Pf15N hat eine monoisotopische Masse von 2033.

4.5.2.2 Invasions-Assays mit Pf15N

Pf15N führte in Konzentration $>200 \mu\text{M}$ zu einer signifikanten Abnahme der Invasion, wohingegen die Pf15N-Mock-Peptide *Mock-8* und *-9*, die in der Aminosäurezusammensetzung identisch waren zu Pf15N, jedoch nicht in ihrer Primärstruktur, die Invasion nicht beeinflussten (Abbildung 29). Außerdem kam es bereits ab einer Pf15N-Konzentration von $50 \mu\text{M}$ zu einer Agglutination der infizierten und nicht infizierten Erythrocyten, weshalb die Zellen vor dem Ausstreichen auf einen Objektträger mit PBS gewaschen wurden, um die agglutinierten RBC voneinander zu lösen und zählbare Präparate zur Bestimmung der Parasitämie anzufertigen. Die *Mock*-Peptide führten auch in der höchsten eingesetzten Konzentration nicht zu einer Agglutination der RBC, was darauf hindeutet, dass die Verklumpung sequenzspezifisch hervorgerufen wird.

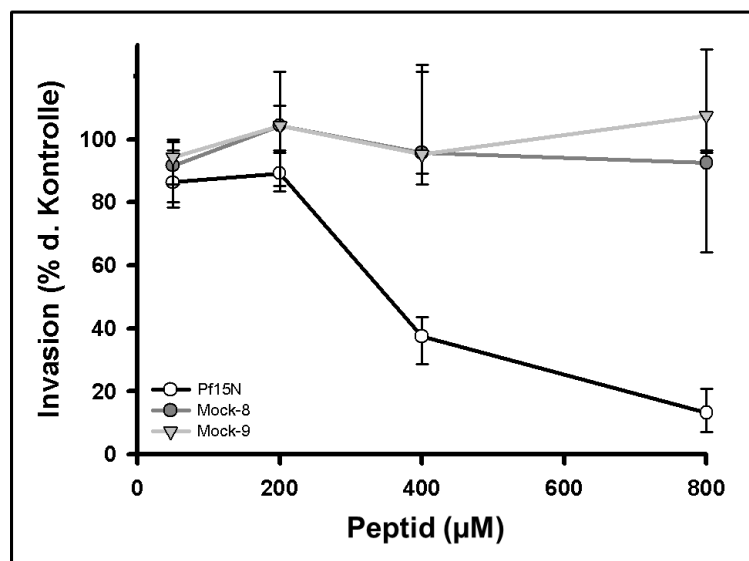


Abbildung 29: Dosis-abhängige Invasionsinhibition durch Pf15N. Durch die Zugabe von Pf15N zu Schizonten war nach 48 h die Ring-Parasitämie deutlich erniedrigt. Als Kontrollen wurden die Pf15N-Mock-Peptide *Mock-8* und *Mock-9* eingesetzt, die keine Invasionshemmung verursachten. Es kam bereits ab einer Konzentration von 50 µM zu einer Agglutination der RBC, wohingegen die Inhibition der Invasion höhere Pf15N-Konzentrationen ab 200 µM benötigte. Dargestellt sind Median und Abweichung von drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmungen.

4.6 Bindungs-Assay mit Pf15N

Aufgrund der Beobachtung, dass Pf15N zu einer Verklumpung von Erythrocyten führte, wurde ein sogenannter Bindungs-Assay verändert nach Thompson *et al.*, 2001 durchgeführt, um sicher zu gehen, dass Pf15N an die Erythrocyten bindet. Es stellte sich außerdem die Frage, ob die *Mock*-Peptide ebenfalls an Erythrocyten binden, jedoch nicht zu einer Verklumpung der Erythrocyten führen. Im Bindungs-Assay wurden Pf15N und die *Mock*-Peptide mit Erythrocyten inkubiert und durch Silikonöl zentrifugiert. An Erythrocyten-gebundene Peptide wurden mit einer NaCl-Lösung von den Erythrocyten eluiert und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung sichtbar gemacht. Zusätzlich wurden folgende Kontrollen durchgeführt. Die ersten beiden Kontrollen enthielten nur das verwendete Peptid ohne Erythrocyten (Abbildung 30, Spur 1) bzw. nur Erythrocyten, die ohne Peptid durch das Öl zentrifugiert wurden. Diese Kontrollen zeigten, dass erstens die Peptide auf der erwarteten Höhe unterhalb der 7 kDa-Markerbande im Gel zu sehen waren (Abbildung 30, Spur 1) und dass zweitens die Behandlung der Erythrocyten mit der NaCl-Lösung zu einer geringfügigen Lyse der Erythrocyten führte, was an der Bande auf

Höhe von 16 kDa zu sehen war, bei der es sich wahrscheinlich um Hämoglobin handelte (Abbildung 30, Spur 2, 3, 4). Die dritte Kontrolle diente dazu herauszufinden, ob das eingesetzte Peptid auch ohne Erythrocyten durch das Silikonöl diffundiert. Hierfür wurden unbehandelte Erythrocyten auf den Boden des Reaktionsgefäßes zentrifugiert, dann wurde das Silikonöl darüber geschichtet und das Peptid, gelöst in Medium, hinzugefügt (Abbildung 30, Spur 2 und 5). Diese Kontrolle zeigte, dass weder Pf15N noch die *Mock*-Peptide ohne Erythrocyten durch das Silikonöl diffundierten, denn sie waren nicht im RBC-Eluat nachweisbar (Abbildung 30, Spur 2), sondern nur im Mediumüberstand (Abbildung 30, Spur 5).

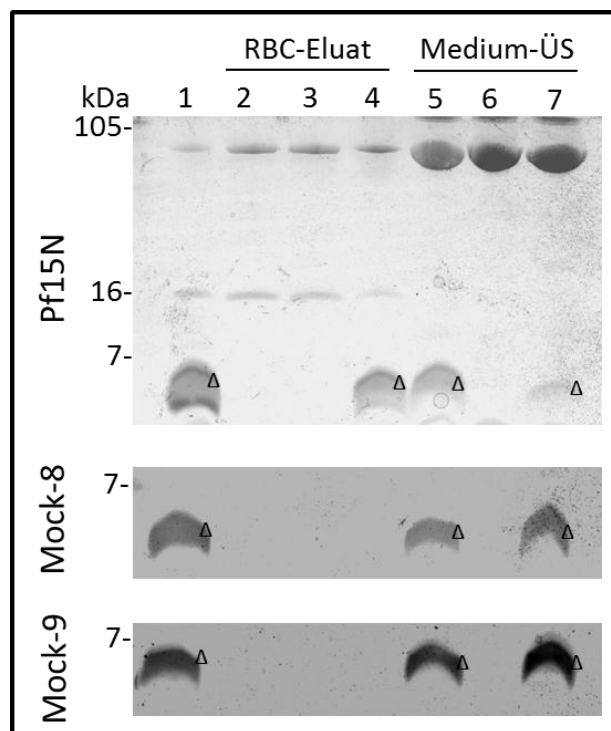


Abbildung 30: SDS-Gele der Bindungs-Assays mit Pf15N, *Mock-8* und *Mock-9*. (1) Kontrolle 1: Peptide ohne RBC. Es sind Proteine aus Spur 2 in Spur 1 übergelaufen. (2)+(5) Kontrolle 2: Peptide, die ohne RBC durch das Silikonöl zentrifugiert wurden, (3)+(6) Kontrolle 3: RBC in Medium ohne Peptide, (4)+(7) Testansätze: Pf15N bzw. *Mock-8* und *Mock-9* mit RBC. Die Peptide wurden mit einem Dreieck (Δ) markiert.

Die Testansätze zeigten, dass die *Mock*-Peptide nicht an die Erythrocyten gebunden haben. Sie waren nicht in den RBC-Eluaten nachweisbar (Abbildung 30, Spur 4), sondern nur in den zugehörigen Mediumsüberständen (Abbildung 30, Spur 7). Pf15N jedoch war deutlich im RBC-Eluat sichtbar, wohingegen die Intensität der Färbung im Mediumsüberstand deutlich abgenommen hatte. Daraus lässt sich schließen, dass Pf15N aus dem Medium an die Erythrocyten gebunden hat und mit ihnen durch das Silikonöl zentrifugiert wurde.

4.7 Untersuchung der Agglutination von Erythrocyten durch Pf15N

4.7.1 Mikroskopische Untersuchung der Agglutination

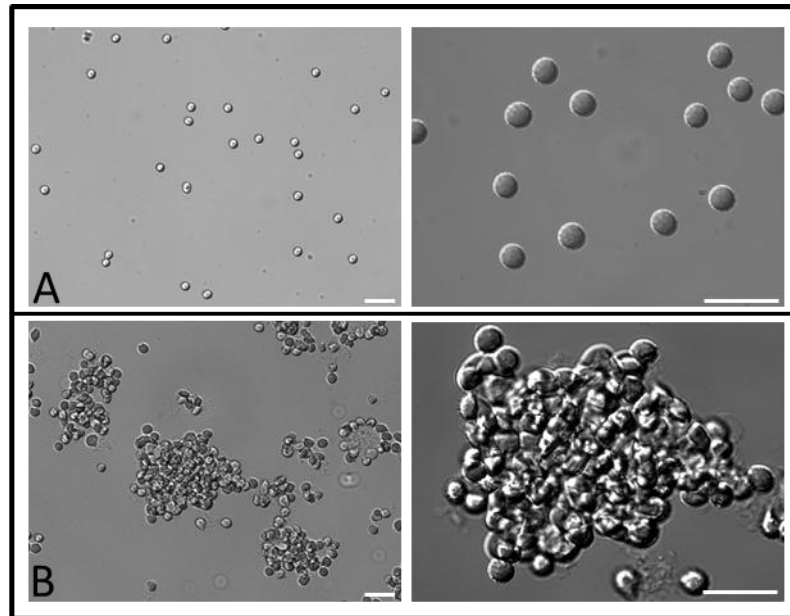


Abbildung 31: Mikroskopische Darstellung der Agglutination von Erythrocyten durch Pf15N. (A) RBC ohne Peptid. **(B)** RBC mit 200 µM Pf15N. Zusätzliche Kontrollen mit den *Mock*-Peptiden zeigten ebenfalls keine Verklumpung der RBC. Die Bilder wurden im DIC-Kanal aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 25 µm.

Die Invasions-Assays mit Pf15N zeigten, dass die Erythrocyten einer *P. falciparum*-Kultur durch die Zugabe des Peptides agglutinierten, wohingegen die *Mock*-Peptide dies nicht taten. Die Agglutination ist unabhängig davon, ob es sich um infizierte oder nicht infizierte Erythrocyten handelte, denn sie ist mikroskopisch auch in nicht infizierten RBC deutlich sichtbar (Abbildung 31). Während in der Kontrolle ohne Peptid die Erythrocyten vereinzelt

in ihrer natürlichen bikonkaven Form vorlagen, bildeten die Erythrocyten, denen Pf15N hinzugefügt wurde, große Zellklumpen aus unterschiedlich vielen Zellen, die im Innern des Aggregats deformiert vorlagen.

Der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von Pf15N in den agglutinierten Zellen zeigte zwei Muster auf. Zum einen waren die Erythrocyten auf ihrer Oberfläche markiert, zum anderen war die Markierung deutlich, aber unstrukturiert in den Zellzwischenräumen zu finden (Abbildung 32).

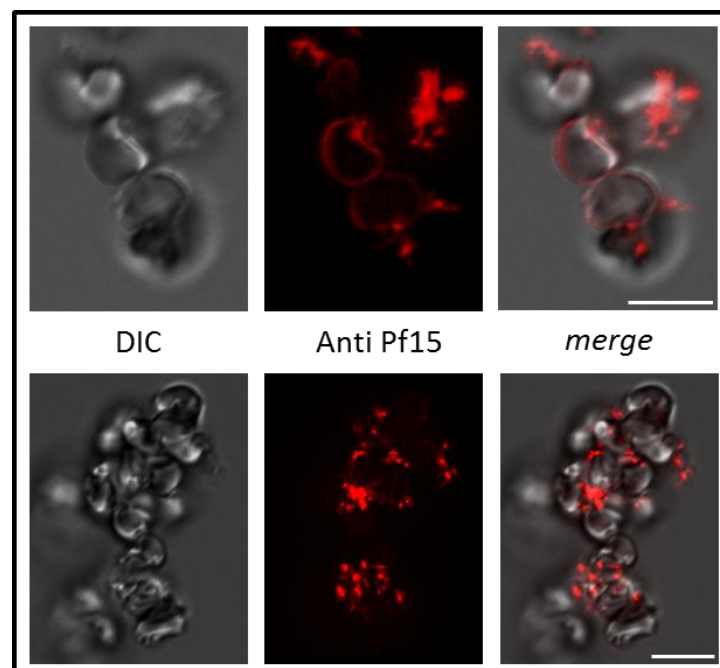


Abbildung 32: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Pf15N an agglutinierten Erythrocyten. Pf15N wurde sowohl auf der Erythrocytenoberfläche, als auch in den Zellzwischenräumen nachgewiesen. **DIC** *Differential Interference Contrast*, **Anti Pf15** Nachweis von Pf15 mit SAbT5052 und Anti-Kaninchen IgG-DyLight549-Antikörpern, **merge** Überlagerung des DIC-Kanals mit dem Fluoreszenzkanal. Der Maßstabsbalken entspricht ca. 10 μm .

4.7.2 Sequenzanalyse von Pf15N und den *Mock*-Peptiden

Wie bereits erwähnt führten die Zugabe von Pf15N zu RBC-Agglutination und die Zugabe der *Mock*-Peptide nicht, was damit zusammenhängt, dass Pf15N an die Erythrocyten bindet, die *Mock*-Peptide dies jedoch nicht tun. Das heißt, dass die Bindung sequenzspezifisch sein muss. Die Aminosäureabfolge der *Mock*-Peptide wurde zufällig

ausgewählt. Nur wenige Aminosäuren liegen an derselben Position wie im Original (Tabelle 11).

Tabelle 11: Sequenzvergleich von Pf15N, Mock-8 und Mock-9 im Ein-Buchstabencode. Aminosäuren, die an gleicher Position stehen, sind farbig hinterlegt.

Nr. AS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Pf15N	G	S	H	G	W	K	N	K	K	Y	E	M	I	E	Y	Y
Mock-8	Y	E	K	G	I	K	Y	M	H	Y	W	K	G	S	E	N
Mock-9	I	G	H	Y	K	E	N	W	Y	E	K	G	Y	S	M	K

Tabelle 12: Hydrophatie der einzelnen Aminosäuren von Pf15N, Mock-8 und Mock-9. Die Aminosäuren wurden in hydrophobe (gelb), schwach hydrophile (hellgrau) und hydrophile (blau) Aminosäuren eingeteilt. Die Einteilung erfolgte für alle Aminosäuren nach Kyte und Doolittle, 1982. Der GRAVY von Pf15N liegt bei -1,587.

Nr. AS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Pf15N	G	S	H	G	W	K	N	K	K	Y	E	M	I	E	Y	Y
Mock-8	Y	E	K	G	I	K	Y	M	H	Y	W	K	G	S	E	N
Mock-9	I	G	H	Y	K	E	N	W	Y	E	K	G	Y	S	M	K

Tabelle 13: Verteilung negativ und positiv geladener Aminosäureseitenketten in Pf15N, Mock-8 und Mock-9. Die Aminosäuren sind farbig hinterlegt nach positiver (grün) und negativer (rot) Ladung.

Nr. AS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Pf15N	G	S	H	G	W	K	N	K	K	Y	E	M	I	E	Y	Y
Mock-8	Y	E	K	G	I	K	Y	M	H	Y	W	K	G	S	E	N
Mock-9	I	G	H	Y	K	E	N	W	Y	E	K	G	Y	S	M	K

Die Bindung an die Erythrocytenoberfläche kann sowohl an Proteine, als auch an die Lipide der RBC-Plasmamembran erfolgen. Die Einteilung der Aminosäuren in hydrophobe und hydrophile Aminosäuren erfolgte nach Kyte und Doolittle, 1982, die den Aminosäuren Hydrophatie-Werte zwischen 4,5 und -4,5 zugeordnet haben. Werte über 0 wurden als hydrophob, Werte zwischen 0 und -1,5 als schwach hydrophil und Werte unter -1,5 als

hydrophil eingeteilt (Tabelle 12). In der Primärstruktur von Pf15N befinden sich an Position 12 und 13 zwei hydrophobe Aminosäuren, wohingegen die restlichen Aminosäuren hydrophil sind. Der *Grand Average of Hydropathy* (GRAVY) beträgt für das gesamte Protein -1,587. Das Protein ist also hydrophil, was auch dadurch bestätigt wird, dass das rekombinant hergestellte Peptid in wässriger Lösung löslich ist.

Eine Bindung an die RBC wäre auch durch eine ladungsabhängige Wechselwirkung zur Erythrocytenoberfläche möglich. Der pI von Pf15N beträgt theoretisch 8,34. Bei einem physiologischen pH von 7,4 liegt das Peptid also positiv geladen vor. Die positiven Einzelladungen der Aminosäureseitenketten von Lysin sind in Pf15N an Position 6, 8 und 9 in unmittelbarer Nachbarschaft. Die beiden negativen Ladungen von Glutamat liegen an Position 11 und 14. Alle anderen Aminosäuren sind bei physiologischem pH ungeladen (Tabelle 13).

4.7.3 Agglutination von enzymbehandelten RBC

Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften von Pf15N ist eine Bindung an die Lipidschicht der Erythrocyten unwahrscheinlich. Um die mögliche Bindung an Oberflächenproteine zu untersuchen, wurden nicht infizierte Erythrocyten mit unterschiedlichen Enzymen behandelt, die die Proteine von ihrer Oberfläche abspalten sollten. Die Enzymbehandlung der Erythrocyten zeigte im immunologischen Nachweis, dass Bande-3 und die Glycophorine durch Pronase, Proteinase K und Trypsin gespalten wurden (Abbildung 33). Bande-3 ist deutlich im Coomassie-gefärbten Gel auf Höhe der 98 kDa-Markerbande zu sehen. Nach der Proteasebehandlung verschwindet diese Bande. Die korrespondierenden Banden sind nach der Enzymbehandlung auch mit den Antikörpern nicht mehr nachweisbar. Es entstand aber auf Höhe von ca. 60 kDa ein Spaltprodukt, das sowohl durch die Bande-3- als auch durch die Glycophorin-Antikörper nachweisbar war. Im Coomassie-gefärbten Gel ist auf dieser Höhe nur eine Bande angefärbt.

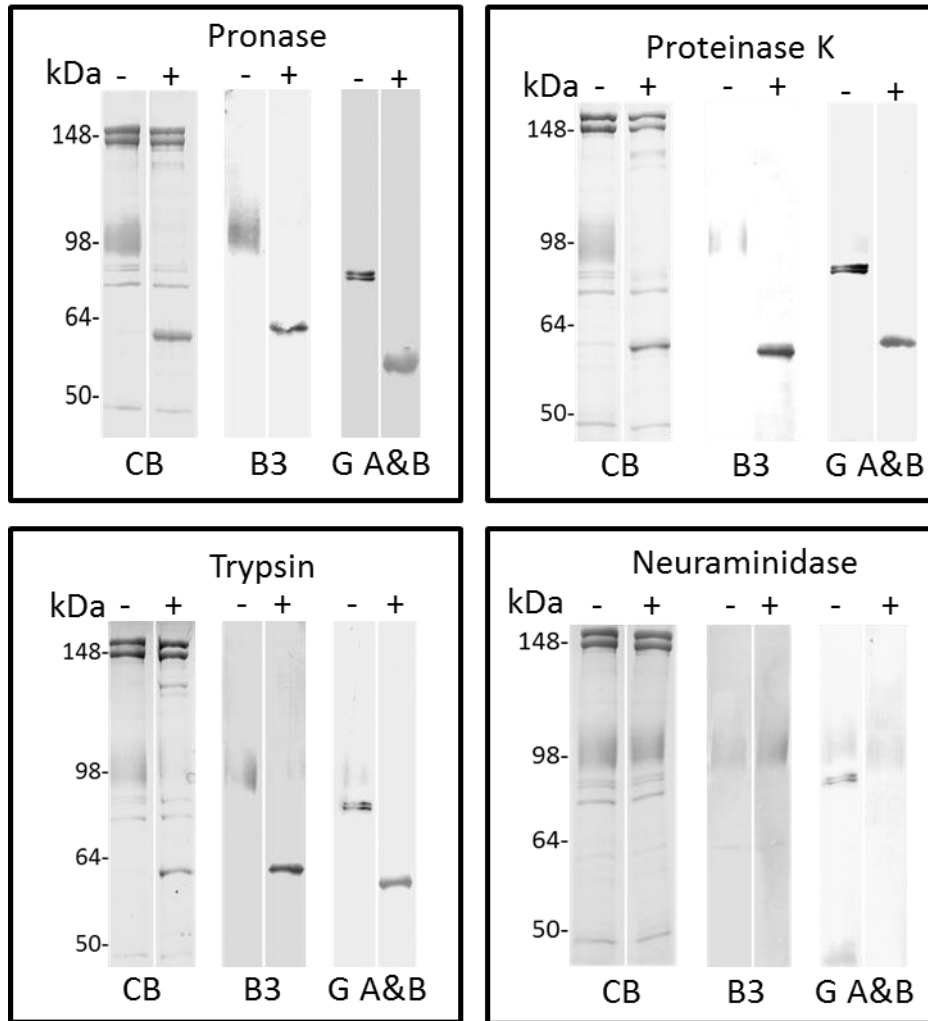


Abbildung 33: Enzymatische Behandlung von Erythrocyten mit Pronase, Proteinase K, Trypsin und Neuraminidase. Membranen enzymbehandelter RBC wurden im SDS-Gel Coomassie-gefärbt (CB). Der Nachweis von Bande-3 (B3) und Glycophorin A und B (G A&B) erfolgte immunologisch mittels Western Transfer. - unbehandelte RBC, + enzymbehandelte RBC.

In den Agglutinations-Assays führte die enzymatische Behandlung der Erythrocyten weder zu einer Lyse der Zellen noch zu Agglutinations-Effekten durch die beiden *Mock*-Peptide. Sie zeigten, dass die enzymatische Behandlung der Erythrocytenoberfläche die Verklumpung der RBC kaum beeinflusst hat (Abbildung 34). Im Vergleich zu unbehandelten Erythrocyten, die ab einer Pf15N-Konzentration von 25 μM vollständig verklumpten, verhielten sich die Trypsin- und Neuraminidase-behandelten RBC identisch. Die Kombination von Neuraminidase und Trypsin, unabhängig davon in welcher Reihenfolge die Behandlung erfolgte, führte auch nicht zu einer Veränderung des Agglutinations-Musters. Auch hier verklumpten die RBC ab einer Konzentration von

25 μM . Der Bindungspartner von Pf15N ist demnach Sialinsäure-unabhängig und Trypsin-resistent.

Proteinase K-behandelte Erythrocyten schienen erst ab 50 μM zu verklumpen und Pronase-behandelte RBC verklumpten erst vollständig ab 100 μM Pf15N, allerdings war auch schon bei 50 μM eine leichte Agglutination zu beobachten. Die Zunahme der benötigten Pf15N-Konzentration wurde auch hier durch die zusätzliche enzymatische Behandlung mit Neuraminidase nicht verstärkt, aber auch nicht verringert. Die Beobachtung, dass Pronase- und Proteinase K-behandelte RBC die doppelte Konzentration an Pf15N benötigen um zu verklumpen, deutet darauf hin, dass die Bindung von Pf15N Protein-abhängig ist. Allerdings wäre zu erwarten gewesen, dass die Verklumpung vollständig aufgehoben wird, wenn die Bindungspartner von der RBC-Oberfläche vollständig abgespalten worden wären.

4.8 Erythrocyten-Bindungs-Assay mit transfizierten HEK293-Zellen

Der Erythrocyten-Bindungs-Assay sollte zeigen, dass nicht nur Pf15N an RBC bindet, sondern dass das gesamte Protein Pf15 in der Lage ist Erythrocyten zu binden. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der zur Expression von Pf15 als GFP-Fusionsprotein führte. Pf15-GFP wurde exprimiert und die Zellen fluoreszierte grün, allerdings wurde das Protein nicht in die Plasmamembran der adhären Zellen inseriert, sondern das Fluoreszenzsignal war intrazellulär lokalisiert (Abbildung 35).

Als Kontrollen wurden der Plasmamembran-ständige Il6-Rezeptor (Chalaris *et al.*, 2010, Abbildung 35) und die lösliche, im Cytosol exprimierte intrazelluläre Domäne von mTACE (ICDmTACE), der murinen ADAM-17-Protease, exprimiert. Diese zeigten das erwartete GFP-Signal in der Plasmamembran bzw. im Cytosol. Die Behandlung mit Saponin, sollte zeigen, ob Pf15-GFP löslich oder membranständig exprimiert wurde. Saponin durchlöcherte die Membran der Zellen, was auch an den morphologischen Veränderungen im DIC-Kanal zu erkennen war, so dass lösliche Proteine aus dem Cytosol herausdiffundierten. Anhand der Kontrollen wurde deutlich, dass das Fluoreszenzsignal des membranständigen Il6-Rezeptors sich nicht veränderte, wohingegen das lösliche ICDmTACE-GFP nicht mehr in den Zellen zu sehen war. Die Fluoreszenz von Pf15-GFP blieb ebenfalls nach der Saponinbehandlung erhalten. Pf15 wurde von den HEK293-Zellen also membranständig synthetisiert, vermutlich ins Endoplasmatische Reticulum transportiert, aber nicht in die Plasmamembran inseriert.

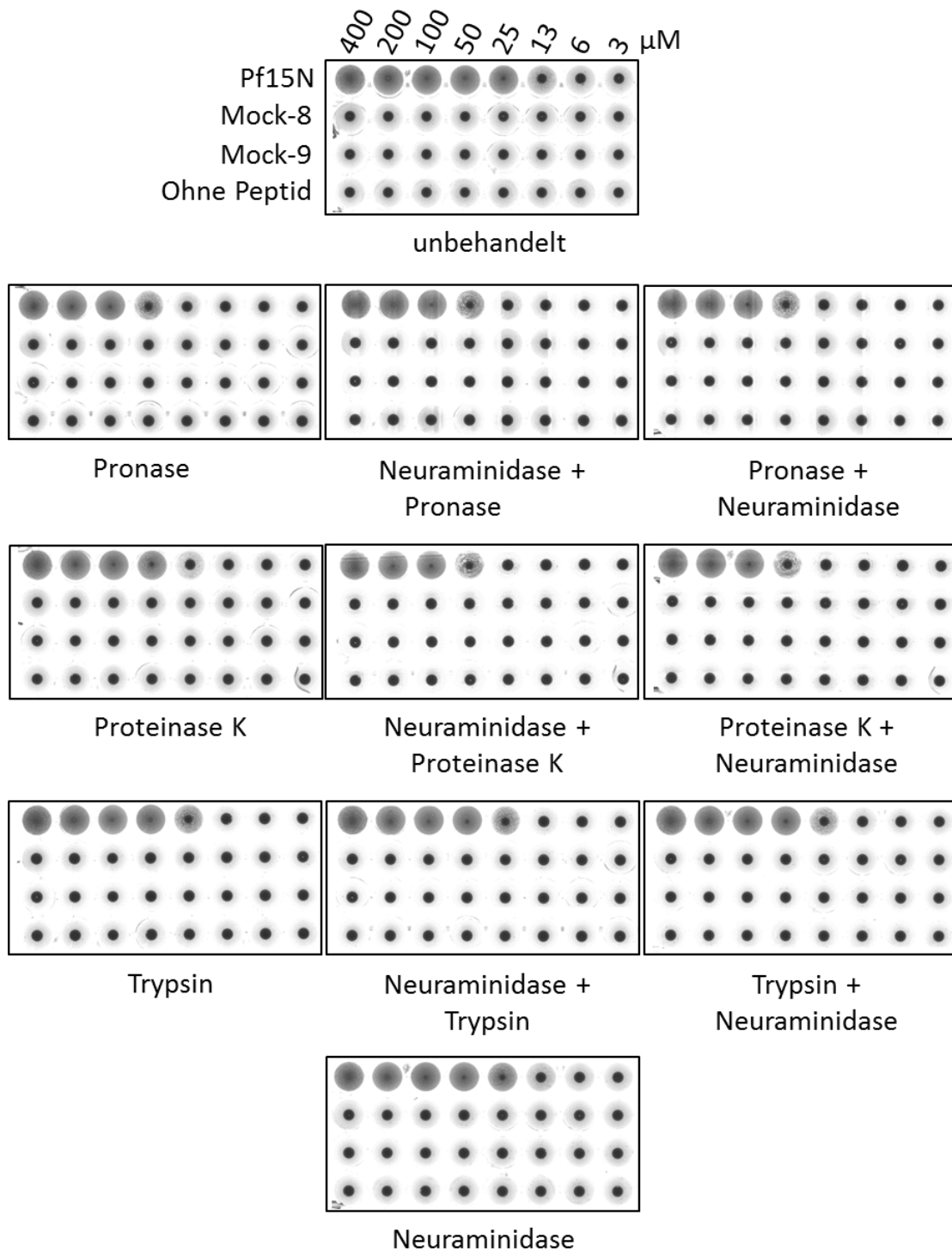


Abbildung 34: Agglutination von unbehandelten und enzymbehandelten RBC durch Pf15N. Die Erythrocyten wurden mit den angegebenen Enzymen behandelt und anschließend mit einem Hämatokrit von 1,5 % mit den Peptiden Pf15N, *Mock-8* und *Mock-9* in Spitzboden-Mikrotiterplatten inkubiert. RBC, die nicht agglutinieren, sammeln sich in der Spitze der Vertiefung, wohingegen agglutinierte RBC über den gesamten Boden der Vertiefung flächig ausgebreitet sind. Die Peptid- und Konzentrationsangaben sind auf alle Einzelabbildungen übertragbar.

Da der Il6-Rezeptor Plasmamembran-ständig ist, sollte durch die Fusion des N-Terminus des Il6R, der das Signalpeptid enthält, mit dem Pf15-Protein, dem das eigene vorhergesagte Signalpeptid entfernt wurde (Pf15oSP), auch das Il6R-Pf15-GFP-Fusionsprotein in die Plasmamembran inseriert werden. Für den Il6R wurde durch SignalP-NN die Signalpeptidase-Schnittstelle an Position 19 und durch SignalP-HMM an Position 21 vorhergesagt. Durch Anfügen der ersten 19 bzw. 21 Aminosäuren an Pf15 wurden die entstandenen Fusionsproteine nicht in die Plasmamembran inseriert. Die Anzahl der angehängten Aminosäuren des N-Terminus des Il6R wurde schrittweise erhöht, bis das GFP-Fusionsprotein, das aus den ersten 61 Aminosäuren des Il6R und aus Pf15oSP bestand, an der Zelloberfläche lokalisiert wurde (Abbildung 35, IL6R-Pf15-GFP). Auch wenn die anderen getesteten Fusionsproteine mit kürzeren Anteilen des N-Terminus des Il6-Rezeptors, nicht offensichtlich an die Membran transportiert wurden, hätte ein Bruchteil der synthetisierten Proteine trotzdem in die Plasmamembran inseriert werden können, der jedoch mikroskopisch nicht sichtbar war. Deshalb wurden mit jeder transfizierten Zelllinie Erythrocyten-Bindungs-Assays durchgeführt. Diese waren jedoch immer negativ und zeigten keine vermehrte RBC-Anlagerung an die adhärenen Zellen. Die Erythrocyten wurden vollständig von den transfizierten HEK-Zelle abgewaschen. Auch die Il6R-Pf15-GFP-exprimierende HEK293-Zellen, deren Fusionsprotein offensichtlich an die Membran transportiert wurde, banden keine Erythrocyten. Die Erythrocyten wurden vollständig von den transfizierten HEK-Zellen abgewaschen.

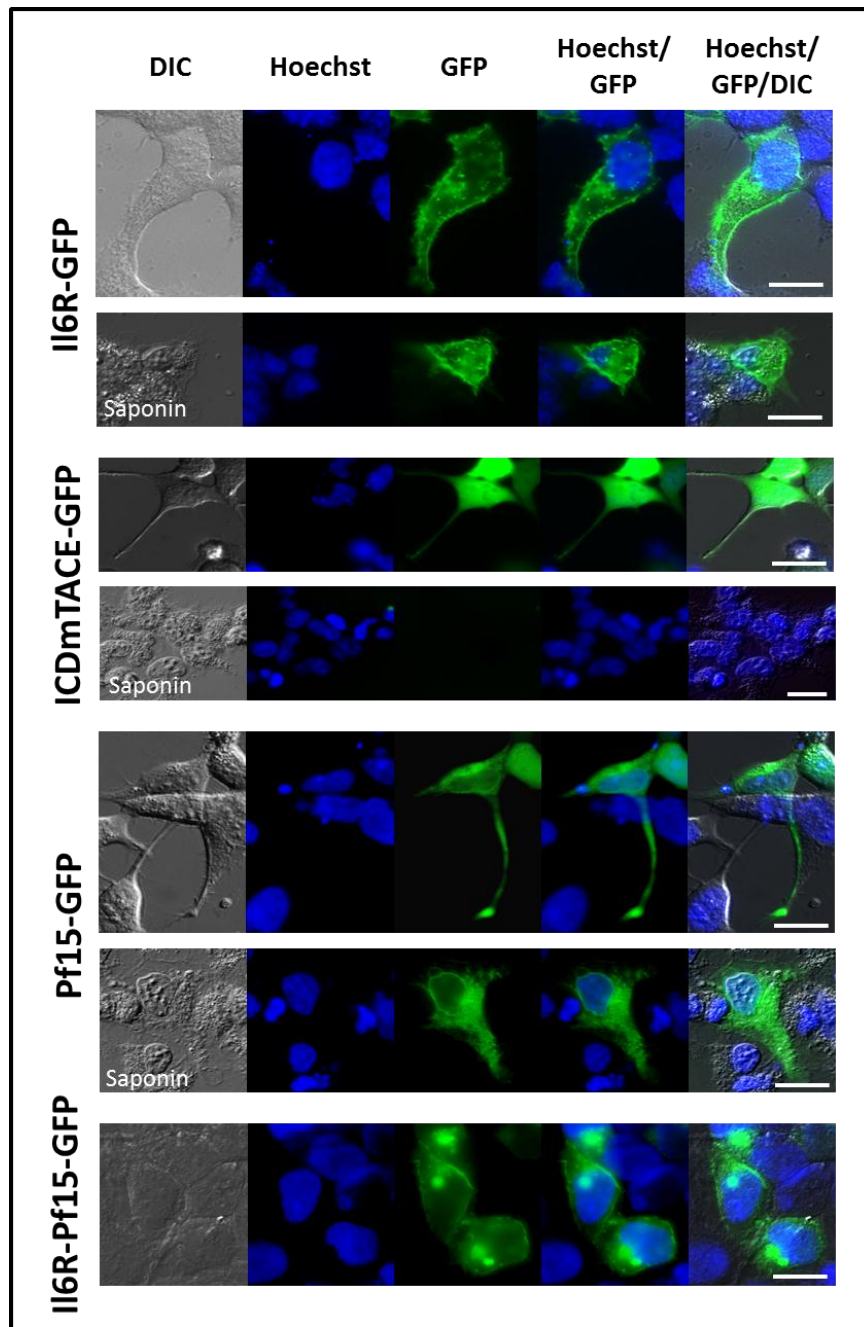


Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK293-Zellen. Adhärenzte HEK293-Zellen wurden transient transfiziert, so dass sie den Il6-Rezeptor (Il6R-GFP), die intrazelluläre Domäne von mTACE (ICDmTACE-GFP), Pf15 (Pf15-GFP) und Pf15 ohne intrinsisches Signalpeptid, sondern mit den ersten 61 Aminosäuren des Il6-Rezeptors (Il6R-Pf15-GFP), als GFP-Fusionsproteine exprimierten. Der Il6-Rezeptor ist in der Plasmamembran, ICDmTace cytosolisch lokalisiert. Die Zellen wurden außerdem mit Saponin behandelt, um cytosolische Proteine auszuwaschen und zu zeigen, dass sowohl Il6R- als auch Pf15-GFP membrangebunden exprimiert wird. Das Fusionsprotein Il6R-Pf15-GFP wurde in die Plasmamembran der HEK293-Zellen inseriert. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

5 Diskussion

Die erythrocytäre Entwicklung der Malariaerreger ist verantwortlich für die Symptomatik der Krankheit. Die Entwicklung eines effektiven Impfstoffes gegen die Blutstadien des Parasiten ist eine Möglichkeit die Malaria zu kontrollieren oder zumindest die Symptome abzuschwächen (Mazumdar *et al.*, 2010). Merozoiten sind die invasiven Stadien von *Plasmodium falciparum*. Sie sind die einzigen Stadien, die während der erythrocytären Entwicklung kurze Zeit extrazellulär vorliegen und dem Immunsystem des Menschen ausgesetzt sind. Ihre zelluläre Ausstattung dient fast ausschließlich der Erkennung, Bindung und Invasion der Wirtszellen. Der Invasionsprozess ist sehr komplex und an eine Reihe hierarchisch geordneter molekularer Wechselwirkungen zwischen Parasiten- und Wirtszellproteinen gekoppelt. Die dazu benötigten Proteine sind vor allem auf der Merozoitenoberfläche und in den Apikalorganellen lokalisiert (Ocampo *et al.*, 2004). Aufgrund dessen sind die in der Arbeit von J. Fritsch identifizierten Proteine Pf14, Pf15, Pf38 und Pf117 interessante Proteine, die hinsichtlich ihrer Funktion in den Merozoiten untersucht werden sollten. Aufgrund ihrer Konservierung und der Existenz von orthologen Proteinen innerhalb der Apicomplexa, wurde vermutet, dass sie eine essentielle Funktion während der asexuellen Phase der Entwicklung haben. Da die Proteine bisher im Rahmen einer Membranpräparation, die auf PV- und TVN-Membranen abzielte, und einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse der daraus isolierten Membranproteine identifiziert wurden, wurden verschiedene Methoden angewendet, um die Proteine auch in isolierten Karbonat- und Hochsalzpuffer-behandelten Merozoitenmembranen zu identifizieren. Nachdem diese Zielproteine mit Hilfe von konventionellen Proteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese (IEF/SDS) und 2D-16-BAC-SDS-PAGE mit anschließender massenspektrometrischer Analyse nicht identifiziert wurden, wurden die Merozoitenmembranproteine in SDS-Probenpuffer gelöst und nach 1D-SDS-PAGE mittels nano-LC-ESI-MS identifiziert. Die Analyse von Membranproteinen mittels konventioneller 2D-Proteomanalyse ist sehr schwierig aufgrund der geringen Löslichkeit hydrophober Membranproteine in nicht ionischen Detergenzien, die für die IEF verwendet werden, und ihrer Neigung zu Aggregation während der isoelektrischen Fokussierung (Klein *et al.*, 2004), wodurch die Zielproteine mit dieser Methode wahrscheinlich nicht identifiziert wurden. Durch den Einsatz des kationischen Detergenz 16-BAC in der ersten Dimension einer 2D-16-BAC-SDS-PAGE wird die Solubilisierbarkeit von

Membranproteinen erhöht, bringt jedoch die Schwierigkeit mit sich, dass es beim Wechsel der Detergenzien von der ersten zur zweiten Dimension mit SDS zu Proteinverlusten kommen kann (Santoni *et al.*, 2000). Außerdem benötigt die 2D-Proteomanalyse zur Visualisierung besonders sensitive Färbemethoden, um Proteine, die in niedriger Kopienzahl pro Zelle synthetisiert werden, sichtbar zu machen. Die Verwendung der 1D-SDS-PAGE bringt den Vorteil, dass Membranproteine in SDS sehr gut löslich sind und elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Dadurch, dass die Auftrennung in nur einer Dimension erfolgt, kommt es allerdings nicht zu einer Separierung einzelner Proteine, wie in der 2D-PAGE, sondern die einzelnen Banden bestehen gegebenenfalls aus mehreren sich überlagernden Proteinen. Durch Anwendung der nano-LC-ESI-Massenspektrometrie konnten diese Proteingemische nach tryptischer Spaltung, schnell, effizient und mit hoher Massengenauigkeit analysiert werden. Die massenspektrometrische Analyse ausgesuchter Banden des 1D-SDS-Gels mit den Proteinen der Merozoitenpräparation ergab, dass nur 26 % der identifizierten Proteine mindestens eine vorhergesagte Transmembrandomäne besaßen. Bei den übrigen 74 % handelte es sich vermutlich hauptsächlich um lösliche Proteine, obwohl die Merozoitenmembranen mit Hochsalz- und Karbonatpuffer gewaschen wurden, um die löslichen Proteine zu entfernen. Neben Proteinen mit unbekannter Funktion bzw. Lokalisation, die einen Anteil von 17 % ausmachten, waren 70 % der identifizierten Proteine stadienunspezifischen Funktionen und Lokalisationen zugehörig. 7 % waren Merozoiten-spezifisch, darunter Proteine des Apikalkomplexes und der Merozoitenoberfläche. In der Anreicherung der Merozoiten waren in Giemsa-gefärbten Ausstrichen keine intakten infizierten Erythrocyten sichtbar, allerdings zeigte die Identifikation von Proteinen, die in die PV und RBC exportiert werden und membranassoziiert sind, dass sich vermutlich Membranfragmente der PVM, des TVN und der RBC-Plasmamembran in der Präparation befanden, die mikroskopisch nicht sichtbar waren.

2006 waren es 24 bekannte bzw. mutmaßliche Oberflächenproteine, darunter auch Pf38 (Cowman und Crabb, 2006), und ihre Anzahl vergrößert sich zunehmend durch die Identifikation weiterer Oberflächenproteine (Wickramarachchi *et al.*, 2009). Zu der Familie der MSP gehören fast ausschließlich Proteine, die ein oder zwei EGF-ähnliche Domänen am C-Terminus aufweisen und deren membrangebundene Mitglieder über einen GPI-Anker verfügen (Gaur *et al.*, 2004). Weitere bisher identifizierte Oberflächenproteine, u.a. Pf38, besitzen Cystein-reiche Domänen („6-Cys“), die auch in Proteinen auf der Oberfläche von Gameten und Sporozoiten gefunden wurden (Cowman und Crabb, 2006). Die Identifizierung der Merozoitenoberflächenproteine Pf14, Pf15 und Pf117 erhöhen die

Anzahl der bekannten Oberflächenproteine um drei. Sie zeigen jedoch keine homologen Sequenzabschnitte zu bisher bekannten Proteinen und es wurde für sie auch kein GPI-Anker vorhergesagt (Vorhersage mit GPI-SOM, <http://gpi.unibe.ch/>, Fankhauser und Mäser, 2005).

Der stadienspezifische Nachweis der zu untersuchenden Proteine zeigte, dass alle Proteine ihr Synthese-Maximum in der späten Entwicklungsphase erreichten. Bis auf Pf14 wurde keines der Proteine in Ringen nachgewiesen. Pf38 und Pf117 wurden sogar erst ab den Schizonten-Stadien nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass diese Proteine lediglich während der späten Entwicklungsphase oder während der Invasion eine Rolle spielen. Es sollte trotzdem untersucht werden, ob die proteinspezifischen Antiseren eine hemmende Wirkung auf die intrazelluläre Entwicklung der Trophozoiten haben und Einfluss nehmen auf Überleben, Entwicklungsgeschwindigkeit oder Freisetzung der Parasiten (Woehlbier *et al.*, 2010). Alle Viabilitäts-Assays verliefen ohne messbare inhibitorische Effekte der Protein A-gereinigten Seren auf die Parasiten. Die Replikation der Parasiten wurde nicht gestört. Vielmehr war im Vergleich zu den Kontrollen ohne Zugabe von Antikörpern eine erhöhte Vermehrung zu beobachten. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Antikörper bereits früh im asexuellen Zyklus zu den Trophozoiten hinzugefügt wurden, so dass diese ca. 24 h Stunden Zeit hatten, die IgG als zusätzliche Nahrungsquelle zu nutzen und sich dadurch möglicherweise besser entwickelten. Im Invasions-Assay wurde nur die Wirkung der Antikörper auf die Entwicklung zwischen Schizonten und Ringstadium untersucht. Dadurch dass Schizonten die Schizogonie vollenden und kaum noch Nährstoffe aufnehmen, werden die Antikörper in diesem Assay vermutlich nicht endocytiert und können in der späten Entwicklungsphase in höheren Konzentrationen auf die Parasiten wirken als im Viabilitäts-Assay. Die Invasionsfähigkeit von Merozoiten in die Wirtszellen, kann nicht, wie im Viabilitäts-Assay, mit SYTOX® *Green* quantifiziert werden, weil dieser in die DNA interkaliert und es dadurch in Abhängigkeit von der DNA-Menge zu einem messbaren Fluoreszenzsignal kommt. Während der Freisetzung der Merozoiten und der Invasion von Erythrocyten kommt es jedoch nicht zu einer Veränderung der DNA-Menge, so dass die Parasitämie ausgezählt werden musste, um eine Hemmung der Ruptur oder Invasion der Merozoiten zu quantifizieren. Lediglich die Antikörper gegen Pf15 zeigten inhibitorische Effekte, was ihn zum vielversprechendsten Kandidaten in dieser Arbeit machte.

Pf38

Pf38 wurde immunfluoreszenzmikroskopisch in den Rhoptrien und teilweise auf der Merozoitenoberfläche lokalisiert (Fritsch, 2007, Sanders *et al.*, 2005). Diese Lokalisation wurde in dieser Arbeit bestätigt. In Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurde, wie es für Proteine der Rhoptrien bekannt ist (Gaur *et al.*, 2007), ein starkes Fluoreszenzsignal in Form von Doppelpunkten am apikalen Pol von intra- und extrazellulären Merozoiten gesehen, das sich auch teilweise auf die Merozoitenoberfläche erstreckte. Die in am BNI in Hamburg hergestellten transgenen Parasiten, die Pf38 mit einem C-terminal angehängtem GFP-Protein exprimierten, fluoreszierten nur sehr schwach, so dass eine Lokalisation anhand dieser Zelllinie nicht durchgeführt werden konnte. Interessanterweise haben Sanders *et al.*, 2005 Fluoreszenzbilder einer GFP-Pf38 exprimierenden *P. falciparum*-Zelllinie veröffentlicht, in der das GFP N-terminal an Pf38 fusioniert wurde. Diese transgene Linie zeigte eine deutliche Expression des GFP-Fusionsproteins am apikalen Pol der Merozoiten. Pf38 ist bisher das einzige identifizierte Rhoptrienprotein dem ein C-terminaler GPI-Anker vorhergesagt wurde (Fankhauser und Mäser, 2005) und das außerdem eine Transmembrandomäne besitzt. GPI-Anker sind aber auch sehr verbreitet unter den Merozoitenoberflächenproteinen, zu denen Pf38 ebenfalls gezählt wird (Cowman und Crabb, 2006). Fritsch zeigte, dass Pf38 in Ring-infizierten Erythrocyten in der PVM mit EXP-2 (Günther *et al.*, 1991) kolokalisiert. Das Transkriptionsprofil und der immunologische Nachweis von Pf38 ausschließlich in Schizonten, nicht in Ringen oder Trophozoiten, deuten darauf hin, dass Pf38 nicht in Ringen synthetisiert wurde, sondern ähnlich wie andere Proteine und Lipide der Rhoptrien während der Invasion in die PVM integriert wurde (Sam-Yellowe, 1988, Lingelbach und Joiner, 1998). Dort ist es Bestandteil der DRM-Rafts der PVM neben PfStomatin und RhopH2 (Sanders *et al.*, 2005, Hiller, 2003). Der Viabilitäts-Assay mit Antikörpern gegen Pf38 zeigte keinen Effekt auf das Überleben oder die Entwicklung der Trophozoiten. Die sprunghaft ansteigende Synthese von Pf38 in Schizonten und die Lokalisation in den Rhoptrien, deuten darauf hin, dass Pf38 erst während der Invasion der Merozoiten eine Rolle spielt. Dies wurde jedoch durch die Invasions-Assays nicht untermauert. Die Invasion der Merozoiten wurde durch die Antikörper nicht blockiert. Garcia *et al.* waren 2009 auf der Suche nach *High Affinity Binding Peptides* (HABP). Es wurden zwei auf Pf38 basierende Peptid-Sequenzen identifiziert, die im Invasions-Assay in der Lage waren, die Invasion zu inhibieren (Garcia *et al.*, 2009). Die Pf38-Epitope, gegen die die in dieser Arbeit verwendeten Kaninchen-Antiseren generiert wurden, sind nicht Bestandteil der identifizierten HABP. Deshalb ist anzunehmen, dass die

Antikörper entweder nicht an der richtigen Stelle binden, um die Funktion von Pf38 zu blockieren, oder dass die Funktion von Pf38 nicht essentiell ist für die Invasion, so dass die Hemmung eventueller Protein-Wechselwirkungen mit Pf38 nicht den Invasionsprozess unterbricht. Es wäre auch möglich, dass die Antikörper während der Invasion, wenn die Rhoptrienproteine sezerniert werden, sterisch daran gehindert werden an Pf38 zu binden oder dass Affinität der Antikörper zu ihrem Epitop nicht stark genug ist, um innerhalb kürzester Zeit an ihr Epitop zu binden, bevor die Pf38-Proteine in die sich bildende PVM integriert werden (Saul, 1987).

Pf117

Pf117 gehört zu den in der Arbeit von J. Fritsch, 2007 identifizierten Merozoitenoberflächenproteinen. Es wurde in dieser Arbeit massenspektrometrisch auch in isolierten Merozoitenmembranen identifiziert. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit Anti-Pf117-Antiserum zeigen eine Waben-förmige Struktur in Schizonten und die Umrandung der Merozoiten, wie sie auch für andere Oberflächenproteine wie MSP-1, STEVOR-Proteine und PfDBLMSP gezeigt wurden (Khattab *et al.*, 2008, Wickramarachchi *et al.*, 2009). Pf117 besitzt ein N-terminales Signalpeptid und eine C-terminale Transmembrandomäne, was vermuten lässt, dass es sich um ein Typ I-Transmembranprotein handelt mit einem großen extrazellulären N-Terminus (Davies *et al.*, 2005). Die Transkriptionsanalysen von Le Roch *et al.*, 2003 und der immunologische Nachweis von Pf117 ausschließlich in Schizonten passen gut zusammen und lassen eine Funktion für Pf117 während der späten Entwicklungsphase in den RBC vermuten. Der Viabilitäts-Assay zeigte keine Wirkung der Antikörper auf die intraerythrocytäre Entwicklung der Trophozoiten und auch morphologisch waren keine Veränderungen zu beobachten. Auch der Invasions-Assay zeigte keinen Antikörper-vermittelten inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung oder Invasion der Merozoiten. Dies könnte vor allem daran liegen, dass Pf117 eine mehr als 100 kDa große, extrazelluläre Domäne besitzt, die Kaninchen-Antikörper jedoch nur gegen zwei Peptid-Epitope generiert wurden. Die Antikörper binden also nur an zwei Stellen an Pf117, so dass es wahrscheinlich ist, dass die funktions-relevanten Bereiche von Pf117 nicht betroffen sind und ihren Zweck erfüllen können, ohne dass die Ruptur der Schizonten oder Invasion der Merozoiten betroffen sind. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass Pf117 nicht direkt an diesen Prozessen beteiligt ist, sondern, ähnlich wie MSP-1, das auf der Merozoitenoberfläche die

löslichen MSP MSP-6 und MSP-7 bindet (Sanders *et al.*, 2005, Kanth *et al.*, 2006), selbst als Ankerprotein für peripher assoziierte Merozoitenoberflächenproteine dient.

Pf14

Pf14 ist ebenfalls eines der Proteine auf der Oberfläche von Merozoiten (Fritsch, 2007). Es wurde im Rahmen dieser Arbeit massenspektrometrisch in Merozoitenpräparationen nachgewiesen. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und die Pf14-GFP-exprimierenden Parasiten zeigten die bereits für MSP-1 beschriebene Wabenstruktur in Schizonten (Sanders *et al.*, 2005) und die Umrandung der Merozoiten. Aufgrund der Tatsache, dass für die Pf14-GFP-Reportergenkonstrukte ein konstitutiver Promotor verwendet wurde, konnte der zeitliche Verlauf der Expression in Ringen und Trophozoiten nicht anhand von lebenden Parasiten verfolgt werden. Die Transkriptionsanalysen von Llinás *et al.*, 2006, ergaben, dass *Pf14* ab dem Trophozoiten-Stadium vermehrt exprimiert wird, ähnlich wie die Proteine, die während der Invasion eine Rolle spielen (Bozdech *et al.*, 2003). Die immunologischen Nachweise des Proteins mittels Western Blot zeigten jedoch, dass Pf14 während der gesamten asexuellen Entwicklung in den Parasiten vorhanden ist. Die Menge an Pf14 nimmt vom Ring- bis zum Schizonten-Stadium kontinuierlich zu. Es ist anzunehmen, dass Pf14, obwohl es in Schizonten angereichert vorliegt, nicht nur in den Merozoiten eine Rolle spielt, sondern auch in den intrazellulären Stadien des erythrocytären Zyklus. Die Viabilitäts-Assays mit den Protein A-gereinigten IgG aus Kaninchen-Antiserum zeigten keinen Effekt auf die intrazellulären Parasiten, wie er für Immunsereen aus Menschen und *Aotus*-Affen gezeigt wurde (Stanley und Reese, 1984, Ray *et al.*, 1994). Ihr Wachstum und ihre Entwicklung waren durch die Zugabe der gereinigten Antikörper nicht verzögert oder reduziert, sondern deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Auch morphologisch waren keine Veränderungen zu beobachten. Dies bedeutet entweder, dass die Bindung der Antikörper die Funktion des Proteins nicht behindert oder dass Pf14 während der erythrocytären Entwicklung keine Funktion hat. Möglich wäre auch, dass die Antikörper zum richtigen Zeitpunkt keinen oder nur eingeschränkten Zugang zu ihren Epitopen hatten. Dies kann zum einen daran liegen, dass die IgG nicht zum intraerythrocytären Parasiten gelangt sind, oder dass die Antikörper von den Trophozoiten als Nahrungsquelle genutzt wurden und dann im Schizontenstadium bzw. Merozoitenstadium nicht mehr in ausreichender Konzentration vorlagen, um die Proteinfunktion zu stören.

Im Falle von Pf14 handelt es sich bei der vorhergesagten Signalsequenz um einen Signalanker, der nicht im Endoplasmatischen Reticulum durch die Signalpeptidase abgespalten wird. Dies wird zum einen durch den SignalP-HMM-Algorithmus vorhergesagt, zum anderen durch die massenspektrometrischen Analysen bestätigt. Sowohl J. Fritsch, als auch die Leiden Malaria Group (vorabpubliziert bei PlasmoDB) wiesen den N-Terminus des Proteins in Merozoiten und Trophozoiten massenspektrometrisch nach (Abbildung 7B).

Antikörper gegen Pf14 wurden in den Seren semi-immuner Erwachsener aus dem Regenwald Kameruns identifiziert (Titanji *et al.*, 2009). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass Pf14 Bestandteil der natürlich auftretenden Immunität der Menschen in Endemiegebieten ist. Bedauerlicherweise wurden die natürlich vorkommenden Antikörper nicht genauer spezifiziert, so dass sie keinen Aufschluss darüber geben, ob die Antikörper gegen den N- oder C-Terminus des Proteins gerichtet waren. In einem Wachstums-Inhibitions-Assay über 60 h wurde die Wirkung von Maus-Antiseren gegen rekombinant hergestelltes Pf14 getestet und festgestellt, dass die Inhibition nur sehr schwach war und auch nur minimal höher als in den Präimmunseren (Titanji *et al.*, 2009). Der in dieser Arbeit durchgeführte Invasions-Assay zeigte ebenfalls keine Hemmung der Invasion. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei dem Signalpeptid von Pf14 um einen Signalanker handelt, so dass der C-Terminus des Proteins wahrscheinlich intrazellulär vorliegt (Abbildung 36).

Die Peptide, gegen die die Kaninchen immunisiert wurden, liegen beide C-terminal von der vorhergesagten Transmembrandomäne, ragen also womöglich ins Zellinnere. Es ist dementsprechend sehr unwahrscheinlich, dass die Antikörper während der Invasion die Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle blockieren, weil mit dem C-Terminus des Proteins keine Interaktion zwischen den beiden Zellen stattfinden kann. Entweder bindet Pf14 nur über seinen N-Terminus an die RBC oder es erfüllt eine ganz andere Aufgabe während des asexuellen Zyklusses, die mit Antikörpern nicht blockiert werden kann. Möglicherweise dient Pf14 als Anker für andere Proteine auf der Merozoitenoberfläche, wie bereits für Pf117 beschrieben oder hat eine Funktion auf der cytoplasmatischen Seite der Zelle, wie z.B. eine Funktion im Bewegungsapparat des Merozoiten, wie sie für die Mitglieder der *Thrombospondin Related Anonoumous Protein* (TRAP)-Familie in Plasmodium Sporozoiten postuliert wird (Kappe *et al.*, 2004).

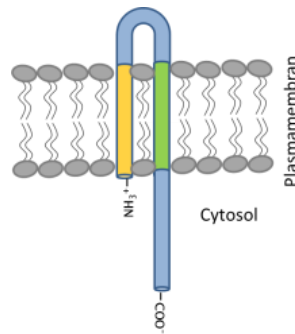


Abbildung 36: Mutmaßliche Orientierung von Pf14 in der Merozoitenplasmamembran. Die Epitope für die Anti-Pf14-Kaninchenantiseren liegen intrazellulär und können Protein-Wechselwirkungen auf der extrazellulären Seite nicht blockieren. Mit der intrazellulären Domäne wären auch Interaktionen mit dem Cytoskelett der Merozoiten möglich.

Pf15

Pf15 ist das vierte Protein, das in dieser Arbeit untersucht wurde. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit nochmals massenspektrometrisch in Merozoitenpräparationen identifiziert. Es befindet sich ebenfalls auf der Oberfläche von Merozoiten, was die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und die Pf15-GFP-exprimierenden Parasiten zeigten. Es wurde versucht in Zusammenarbeit mit Prof. Lucius und seinen Mitarbeitern M. Kölln und F. Lichte vom Anatomischen Institut der CAU Kiel, die Lokalisation zusätzlich auf elektronenmikroskopischer Ebene mit Immunogold-Markierung zu bestätigen. Dies ist weder in angereicherten Schizonten noch Merozoiten gelungen, die entweder mit dem SABT5052-Serum oder mit Protein A-gereinigten anti-Pf15-IgG oder mit den spezifisch gereinigten IgG markiert wurden. Die Antikörperanbindung erfolgte sowohl vor der Fixierung, *Prestaining*, als auch nach der Fixierung, *Poststaining*, der Zellen mit Glutaraldehyd (*Prestaining*) oder PFA (*Poststaining*). In keinem der Ansätze konnten spezifische, reproduzierbare Gold-Markierungen gezeigt werden. Der Strukturehalt der *Prestaining*-Ansätze war sehr gut, dafür wurden aber kaum Goldmarkierungen gefunden. Die Goldmarkierungen der *Poststaining*-Ansätze waren zahlreich vorhanden und deutlich sichtbar, allerdings nicht spezifisch angereichert. Neben den Markierungen in der Plasmamembran, waren auch in anderen subzellulären Strukturen wie dem Cytosol, den Rhoptrien oder dem Zellkern Gold sichtbar, weshalb auf eine Darstellung der Ergebnisse verzichtet wurde.

In den Viabilitäts-Assays mit den Protein A-gereinigten Antiseren SABT5052 und 5053 wurde keine Wirkung der Antikörper auf das intrazelluläre Überleben der Trophozoiten

festgestellt. Die Antikörper bewirkten keine morphologisch sichtbaren Veränderungen der Parasiten und ihrer Entwicklung. Die erhöhte Viabilität von bis zu 25 % deutet darauf hin, dass die Parasiten die Antikörper als Nahrungsquelle verwenden und abbauen, wodurch die Antikörperkonzentration in den Viabilitäts-Assays zum Zeitpunkt der Invasion nicht mehr ausreichend ist, um die Invasion und damit die erythrocytäre Entwicklung zu hemmen. Trotzdem deutet die regulierte und vermehrte Expression und Anreicherung von Pf15 in den späten Stadien der erythrocytären Entwicklung darauf hin, dass Pf15 eine Funktion während der Entlassung oder Invasion der Merozoiten aufweist. Da dieser Prozess der Erythrocytenruptur und der erneuten Invasion der Merozoiten in die RBC sehr schnell erfolgt, müssen die Antikörper entweder eine besonders hohe Affinität zu ihrem Antigen aufweisen, oder in hoher Konzentration vorliegen, um schnell genug an ausreichend Merozoiten zu binden und die Invasion zu inhibieren (Saul, 1987). Mit Hilfe von Invasions-Assays, in denen Schizonten als Ausgangsmaterial verwendet wurden, wurde gezeigt, dass nach der Invasion eine niedrigere Parasitämie vorlag als in der Kontrolle ohne Antikörper. Dies wurde offenbar in den Viabilitäts-Assays nicht gemessen, weil die Invasionshemmung abhängig ist von der Antikörperkonzentration. Da am Ende der Invasions-Assays keine auffällig erhöhte Anzahl an Restschizonten beobachtet wurde, wie sie z.B. durch die Inkubation von polyklonalen Antikörpern gegen MSP-1_{42(FVO)} mit Schizonten von *P. falciparum* zu beobachten sind (Bergmann-Leitner *et al.*, 2009), wird davon ausgegangen, dass nicht die Freisetzung aus den Wirtszellen, sondern die Invasion in die RBC der Angriffspunkt der Antikörper ist.

Die Antikörper-vermittelte Invasionsinhibition in den Invasions-Assays mit Schizonten deutet darauf hin, dass Pf15 während dieses Prozesses eine wichtige Rolle spielt. Es wurde durch spezifische Blockierungen der Antikörper und durch die Verwendung Epitop-spezifischer IgG festgestellt, dass nur die Antikörper gegen das N-terminale Epitop die Invasionshemmung bewirken, wohingegen die Zugabe der Antikörper, die gegen den C-Terminus gerichtet sind, dies nicht taten. Dies gibt allerdings keinen Aufschluss darüber wie die Antikörper die Invasion inhibieren. Sie können verschiedene Mechanismen einsetzen, um die Invasion zu hemmen (Ramasamy *et al.*, 2001). Es wurde beschrieben, dass Antikörper an *P. knowlesi*-Merozoiten binden und zu einer Agglutination der Merozoiten führte. Gleichzeitig wurde eine erniedrigte Parasitämie im Vergleich zur Kontrolle und eine erhöhte Anzahl an mehrfach-infizierten Erythrocyten beobachtet (Miller *et al.*, 1984). Die morphologische Auswertung der Invasions-Assays mit Pf15-IgG zeigte weder agglutinierte Merozoiten, noch eine auffällig erhöhte Anzahl an mehrfach-infizierten Erythrocyten, allerdings ist eine Doppelinfektion bei *P. falciparum*

keine Seltenheit (Lucius und Loos-Frank, 2008). 1997 zeigten Ramasamy und Rajakaruna, dass die asexuelle Entwicklung von Schizonten *in vitro* nach Inkubation mit Antikörpern durch eine Komplement-vermittelte Inhibition der Invasion gestört wurde. Dies kann im Falle der in dieser Arbeit durchgeführten Invasions-Assays ausgeschlossen werden, da die *In-Vitro*-Kultivierung der Parasiten nicht mit Serum durchgeführt wurde, sondern mit AlbumaxII, das keine Komponenten des Komplementsystems enthält. Des Weiteren können Antikörper sowohl die direkte Interaktion zwischen Proteinen auf der Parasiten- und Wirtszelloberfläche blockieren, wie es für EBA-175 postuliert wurde (Sim, 1998), als auch die direkte Wechselwirkung von mehreren Merozoitenproteinen, die zusammen als Ligandenkomplex an die RBC-Membran binden (Li *et al.*, 2004), verhindern.

Für eine zunehmende Anzahl von MSP, darunter auch die Vakzinierungskandidaten MSP-1, -3 und -6 (Urquiza *et al.*, 1996, López *et al.*, 2006, Rodriguez *et al.*, 2009), wurden Peptide identifiziert, die an die Erythrocytenoberfläche binden und die Invasion hemmen (Garcia *et al.*, 2007, Obando-Martinez *et al.*, 2010). Die rekombinante Expression des N-Terminus von Pf15 (Pf15N) in löslicher Form ermöglichte ebenfalls die Durchführung von Peptid-basierten Bindungs- und Invasions-Assays. Auch hier kam es zu einer Dosis-abhängigen Invasionsinhibition, die die Ergebnisse der Antikörper-vermittelten Hemmung unterstützen. *Mock*-Peptide, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung identisch waren zu Pf15N, sich jedoch in der Primärstruktur unterschieden, zeigten keinen inhibitorischen Effekt auf die Invasion. Vermutlich kommt es zwischen Pf15 und der RBC-Oberfläche zu einer direkten Protein-Interaktion kommt, da das lösliche Pf15N erstens an Erythrocyten bindet, wie im Bindungs-Assay gezeigt, und zweitens zu einer Agglutination nicht infizierter Erythrocyten führt. Es wird ausgeschlossen, dass die Agglutination der Erythrocyten und die damit einhergehende verminderte Verfügbarkeit von RBC, Ursache ist für die Invasionsinhibition, da die Agglutination bereits ab Konzentrationen von 25 μM stark ausgeprägt war, die Invasioninhibition jedoch erst ab Konzentrationen größer als 200 μM einsetzte. Immunfluoreszenzmikroskopisch wurde die Bindung von Pf15N an Erythrocyten nochmals bestätigt: Die *Mock*-Peptide wurden in allen Peptid-basierten funktionalen Assays als Kontrollen eingesetzt und zeigten weder in den Invasions-Assays, noch im Bindungs- oder Agglutinations-Assay eine Effekt auf die Parasiten bzw. Erythrocyten. Auf Grund dessen wird vermutet, dass die Pf15N-vermittelte Inhibition, Bindung und Agglutination sequenzspezifisch sind. Pf15N wurde im Bindungs-Assay durch die NaCl-Lösung eluiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung von Pf15N an die RBC reversibel ist. Da aber weder der Antikörper- noch der Peptid-basierte Invasions-Assay geeignet sind, Erkenntnisse über den erythrocytären

Bindungspartner zu gewinnen, wurde die Agglutination enzymbehandelter Erythrocyten näher untersucht. Wie bereits beschrieben ist *P. falciparum* in der Lage, unterschiedliche Moleküle, Bindungspartner und Invasionswege zu verwenden, um in die Wirtszelle einzudringen (Gaur *et al.*, 2004). Die erythrocytären Bindungspartner werden durch Resistenz oder auch Sensitivität gegenüber Protease oder Neuraminidase-Behandlungen definiert (Rayner *et al.*, 2001), weshalb die RBC in den Agglutinations-Assays mit Pronase, Proteinase K, Trypsin und Neuraminidase behandelt wurden. Es zeigte sich, dass nur die Behandlungen mit Pronase und Proteinase K dazu führten, dass die Verklumpung im Vergleich zu unbehandelten RBC erst ab höheren Konzentrationen von 15N einsetzte, wohingegen die Trypsin- und Neuraminidase-Behandlungen keine Auswirkungen zeigten. Der Ligand auf Seiten der Erythrocyten ist also Trypsin-resistent und Neuraminidase-unabhängig. Die *Mock*-Peptide hatten auch auf enzymbehandelte Erythrocyten keine agglutinierende Wirkung. Die Interaktion von Merozoitenoberflächenproteinen mit Glycophorinen ist abhängig von ihrer Sialinsäure (Duraisingh, 2003). Wie in den Western Blots zu sehen ist (Abbildung 33), sind die Glycophorine A und B Trypsin- und Neuraminidase-sensitiv. Laut Thompson *et al.*, 2001 ist auch Glycophorin C Trypsin-sensitiv. Die Glycophorine können also als Interaktionspartner für Pf15N mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Es ist auch nicht anzunehmen, dass Bande-3 als Bindungspartner für Pf15N in Frage kommt, da das Coomassie-gefärbte Gel und der Western Blot von Bande-3 deutlich zeigen, dass die zugehörige Bande nach Trypsin-Behandlung nicht mehr nachweisbar war. Obwohl Bande-3 Trypsin-resistent ist (Thompson *et al.*, 2001), wurde es durch die Trypsin-Behandlung hydrolysiert, weil das verwendete Trypsin (Sigma) eine zusätzliche Chymotrypsin-Restaktivität aufwies, durch die Bande-3 hydrolytisch gespalten werden kann (Goel *et al.*, 2003). Die Behandlung der Erythrocyten-Oberflächenmoleküle mit den Proteasen zeigte in den Coomassie-gefärbten Gelen und den immunologischen Nachweisen von Bande-3 und Glycophorin A und B keine offensichtlichen Unterschiede im Banden-Muster, die erklären könnten, warum Pronase und Proteinase K das Agglutinationsverhalten mit Pf15N veränderten, Trypsin jedoch nicht. Dadurch dass die Agglutination nicht vollständig aufgehoben wurde, ist zu vermuten, dass die Bindungspartner auch nicht vollständig von der RBC-Oberfläche abgespalten wurden und dass die Bindungsstellen zumindest teilweise noch zur Verfügung stehen. Dadurch dass die abundantesten Proteine der Erythrocytenoberfläche, Bande-3 und die Glycophorine, vollständig von der RBC-Oberfläche abgeschnitten wurden, wurde davon abgesehen die Inkubationszeiten mit den Enzymen zu verlängern. Wahrscheinlich sind die Protease-Schnittstellen aufgrund der dreidimensionalen Proteinstrukturen auf der

Oberfläche nicht zugänglich. Es wäre auch möglich, dass andere Oberflächenmoleküle die Bindungsstellen von Pf15N vor den Proteasen abgeschirmt haben. Auch die Behandlung der RBC mit Neuraminidase und den Proteasen in Kombination erhöhte nicht die benötigte Pf15N-Konzentration. Trotzdem deuten die Agglutinations-Assays mit enzymbehandelten RBC darauf hin, dass Pf15N auf der Erythrocytenoberfläche spezifisch an Proteine, wie z.B. die in Tabelle 2 zusammengefassten Adhäsionsmoleküle, oder Zuckerreste, bei denen es sich nicht Sialinsäuren handelt, bindet und nicht an die Lipidbestandteile der Membran. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass Pf15N hydrophil und nicht lipophil ist (GRAVY: -1,587, Kyte und Doolittle, 1982). Die Erythrocytenoberfläche ist vor allem durch das Vorhandensein von den Sialinsäuren der Glycophorine negativ geladen (Hadengue *et al.*, 1998). Pf15N ist bei physiologischem pH positiv geladen, wodurch eine ladungsabhängige Anziehung zwischen Pf15N und der Erythrocytenoberfläche stattfinden kann. Allerdings führte die Entfernung der Sialinsäuren durch Neuraminidase nicht dazu, dass die Agglutination abnahm, so dass sie vermutlich nicht durch elektrostatische Anziehung verursacht wird. Dies heißt aber nicht, dass Pf15 (pI 10,17) *in vivo* nicht trotzdem aufgrund seiner positiven Ladung bei pH7,4 die Anziehung zwischen Merozoit und Erythrocyt unterstützt.

Agglutination von Erythrocyten wird im Falle von *P. falciparum* auch mit dem sogenannten *Rosetting* in Verbindung gebracht, d.h. die Bindung von infizierten und nicht infizierten Erythrocyten über Parasitenproteine, die bereits früh während der asexuellen Entwicklung auf die RBC-Oberfläche transportiert werden, und die Anlagerung dieser Zellklumpen ans Kapillar-Endothel vermitteln (Wahlgren *et al.*, 1992). Diese Funktion von Pf15 kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die an die Erythrocytenmembran exportierten Proteine für die Anlagerung ans Endothel, wie z.B. das *Knob-Associated Histidine-Rich Protein* (PfKAHRP-1), werden bereits direkt nach der Invasion synthetisiert und exprimiert (Bozdech *et al.*, 2003), wohingegen Pf15 erst zum Ende des Entwicklungszyklusses seine maximale Expression erreicht. Außerdem zeigten weder Trophozoiten noch Schizonten eine Erythrocytenoberflächen-Markierung in den Immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen.

Durch *Crosslinking*-Experimente mit Hilfe des Kreuzvernetzers Bis[sulfosuccinimidyl]-Suberate (BS³) nach der Methode beschrieben in Ocampo *et al.*, 2004, sollte der Bindungspartner von Pf15N auf der Erythrocytenoberfläche identifiziert werden. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel wurden keine Bandenverschiebungen ausgemacht, die aufgrund der Bindung von Pf15N und BS³ entstanden sein könnten. Das Bandenmuster der kreuzvernetzten RBC-Membranen sah identisch aus zu den unbehandelten und den

BS³-inkubierten (ohne Pf15N) RBC. Möglicherweise ist der Bindungspartner unterhalb der Coomassie-Nachweisgrenze und deshalb nicht im SDS-Gel nachweisbar. Mit Hilfe des immunologischen Nachweises nach Western Transfer der kreuzvernetzten Proteine wurden im Vergleich zu den Kontrollen ohne Pf15N keine spezifischen Banden angefärbt. Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass BS³ an primäre Amine, also an den N-Terminus von Proteinen und an Lysinseitenketten (K), bindet. Das Bindungsepitop auf Pf15N, das mit Hilfe der Antikörper nachgewiesen wird, enthält drei Lysine, an die jeweils ein BS³-Molekül binden kann. Dadurch wurde das Epitop für die Antikörper möglicherweise nicht mehr erkennbar und Pf15N konnte immunologisch nicht mehr nachgewiesen werden.

Da es sich bei Pf15N lediglich um ein Fragment des Gesamtproteins handelte, sollte durch die Expression von Pf15 auf der Oberfläche von adhärenenten HEK293-Zellen, ein Erythrocyten-Bindungs-Assay durchgeführt werden. Nach der Transfektion der HEK293-Zellen wurde Pf15 als GFP-Fusionsprotein zwar exprimiert, jedoch nicht in die Plasmamembran der adhärenenten Zellen inseriert. Pf15 ist intrazellulär in perinuklearen Strukturen lokalisiert worden, bei denen es sich vermutlich um das Endoplasmatische Reticulum handelt (Wegierski *et al.*, 2009). Prinzipiell scheint das intrinsische Signalpeptid also durch die HEK293-Zellen erkannt zu werden und zur Einleitung des sekretorischen Weges in das ER zu führen, jedoch nicht zur Insertion in die Plasmamembran. Unter Berücksichtigung der zellulären Ausstattung eines Merozoiten und der parasitischen Lebensweise ist es möglich, dass die HEK-Zellen nicht in der Lage sind die parasitischen Oberflächenmoleküle auch in die Plasmamembran zu inserieren. Ein klassisches N-terminales Signalpeptid ist Bestandteil vieler Parasitenproteine und führt zum Transport ins ER und dann zur Verteilung der Proteine zur Plasmamembran, in die Rhoptrien die Micronemen, die Dense Granules und zum Export der Proteine in die Wirtszelle (Lingelbach und Joiner, 1998, Saridaki *et al.*, 2008). Aufgrund des Vorhandenseins zusätzlicher Organellen des Apikalkomplexes muss der Parasit ein komplexeres sekretorisches System besitzen mit einer Vielzahl zusätzlicher intrinsischer Signale (Waller *et al.*, 2000, Wickham *et al.*, 2001, Treeck *et al.*, 2006, Ghoneim *et al.*, 2007). Bis auf das vorhergesagte Signalpeptid weist Pf15 keine kanonischen Signalsequenzen, wie z.B. ein Kernlokalisierungssignal, ein ER-Retentionssignal oder das parasitenspezifische PEXEL-Motiv für den Export in die Wirtszelle auf (Dingwall und Lasley, 1991, Marti *et al.*, 2004, Külzer *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde für *Plasmodium* auch festgestellt, dass die zeitliche Abfolge der Proteinsynthese relevant ist für den korrekten Transport der Proteine in die Zellen (van Dooren *et al.*, 2000, Rug *et al.*, 2004, Treeck *et al.*, 2006). Wahrscheinlich

ist das Expressions- und Transportsystem der HEK293-Zellen ungeeignet, Membranproteine von *Plasmodium* an die richtige Zielstruktur zu transportieren.

In Anlehnung an die Experimente von Chitnis und Miller, 1994 und Fraser *et al.*, 2001, in denen Peptidfragmente von Parasitenproteinen mit Hilfe des N-Terminus des Herpes Simplex Virus Glycoprotein D auf der Oberfläche von COS-7-Zellen exprimiert wurden, sollte Pf15 durch Anfügen des N-terminalen Signalpeptides des Il6-Rezeptors vor Pf15oSP an die Plasmamembran transportiert werden. Obwohl das Il6R-Signalpeptid von SignalP mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Länge von maximal 21 AS vorhergesagt wurde (Emanuelsson *et al.*, 2007), brachte die Fusion des Il6R-Signalpeptides mit Pf15 nicht den gewünschten Effekt. Erst durch das Anfügen der ersten 61 AS des Il6-Rezeptors wurde Pf15 sichtbar an die Plasmamembran der HEK-Zellen transportiert. Die Erythrocyten-Bindungs-Assays zeigten, dass die Expression des Il6R-Pf15-GFP-Fusionsproteins nicht zu einer vermehrten Bindung von Erythrocyten an transfizierte HEK293-Zellen führte. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Ergebnisse dieses Assays aussagekräftig sind. Angenommen das Signalpeptid des Fusionsproteins wird hinter AS 21 durch die Signalpeptidase abgeschnitten, bleiben noch 40 AS des Il6R, die N-terminal vor dem *Plasmodium*-Protein angefügt sind und die Bindung der Erythrocyten an Pf15 erheblich stören können.

Wie bereits erwähnt erfolgte die Auswahl der Proteine in der Arbeit von J. Fritsch anhand einer *In-Silico*-Analyse nach bestimmten Kriterien. Ein Merkmal sollte das Vorhandensein konservierter, orthologer Proteine innerhalb der Apicomplexa sein. Diese wurden in *P. vivax*, *knowlesi*, *berghei*, *yoelii yoelii* und *chabaudi chabaudi* gefunden und die vorhergesagten Proteinsequenzen miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu den murinen *Plasmodium*-Arten sich die N-Termini der Protein-Orthologe der humanpathogenen Arten untereinander stärker ähneln (Abbildung 37). Die Sequenzen von *P. vivax* und *knowlesi* unterscheiden sich im Bereich von Pf15N um nur eine Aminosäure. Pf15 trägt an Position 34 ein Isoleucin (I), das in *P. vivax* und *knowlesi* durch ein strukturell ähnliches Valin (V) ausgetauscht wurde. Die Aminosäureaustausche an den anderen Positionen der murinen *Plasmodium*-Arten ähneln sich strukturell weniger. Das aromatische Tryptophan (W) mit Indolring wurde gegen das Schwefel-haltige Methionin (M) ausgetauscht, Lysin (K) gegen Arginin (R), das zwei zusätzliche Stickstoffhaltige-Gruppen enthält und Glutamat (E) wurde gegen Aspartat (D) ausgetauscht. Aufgrund dieser stark veränderten Sequenz in den murinen Arten, könnte eine Funktion des N-Terminus von Pf15 für die wirtszellspezifische Erkennung von Erythrocyten aus Menschen und Affen postuliert werden.

Pf15N	
<i>P. falciparum</i>	<u>MLGLIFKVVIFIVGYVLPVGLSLHGWNKKYEMIEYYLKYVYFFVIFENLVTPSLGRVIY</u> 60
<i>P. vivax</i>	MFCALFKMIIFVVGYLEPVGLSLHGWNKKYEMVEYYLKYVYFFVVFENVVTPSIGAVIY 60
<i>P. knowlesi</i>	MFGALEFKLIIFVVGYLEPVGLSFHGWKNKKYEMVEYYLKYVYFFVVFENIVTPSIGALIY 60
<i>P. berghei</i>	MICFIVKLLIFIVAYVPSGMAFHGMKNKRYDMVEYYLKYIYFFVVFHEHLITPTFGRFIS 60
<i>P. yoelii</i>	MICFIVKLLIFIAAYIVPSGMAFHGMKNKRYDMVEYYLKYIYFFIIFEHLITPTFGRFIS 60
<i>P. chabaudi</i>	MICLIVKLLIFFVAYIVPSGMAFHGMKNKRYDIVEYYLKYIYFFVVFHEHLITPTFGRFIS 60
<i>P. falciparum</i>	<u>RISSEFLWCILHLTIYIILITPKLNYLNSIYDKISKINNQNIGLYWNKYLVNPLNDKFNK</u> 120
<i>P. vivax</i>	KISGFIVCLLHLALYLVLITPKFNLYLNIIYEKSVKVNQNNVTLYLNNYVVNPLNDQVNK 120
<i>P. knowlesi</i>	KISSEFIWCLIHLSLYVVLIIIPKFNLYLNIIYEKSVKVNQNNVTLYINNYIVNPLNDKVNK 120
<i>P. berghei</i>	GINCFIWGIHLSLYVVLIIIPKFNLYLNIIYEKVAKINGDNNISFYFNYYIISPLNMKANA 120
<i>P. yoelii</i>	GINCFIWGIHLSLYVVLIIIPKFNLYLNIIYEKVAKINGDNNISFYFNYYVISPLNMKANA 120
<i>P. chabaudi</i>	GINCFIWGIHLSLYVVLIIIPKFNLYLHNIYEKVAKINGDNNISFYFNYYIISPLNSKATA 120
<i>P. falciparum</i>	<u>IVKKLKT</u> ----- 128
<i>P. vivax</i>	IVKKLKT----- 128
<i>P. knowlesi</i>	IVKKLKT----- 128
<i>P. berghei</i>	IIKKLKT----- 128
<i>P. yoelii</i>	IIKKAPCKLFQNFVFFFKIKFDDI 145
<i>P. chabaudi</i>	IIKKLKT----- 128

Abbildung 37: Sequenzvergleich der Pf15-Orthologe aus anderen *Plasmodium* spp.. Es wurden die zu Pf15 orthologen Sequenzen der humanpathogenen Arten *P. vivax* (PVX_091495), *P. knowlesi* (PKH_091470), *P. falciparum* (PF11_0179) mit den Sequenzen der murinen Arten *P. chabaudi chabaudi* (PCHAS_091360) und *P. berghei* (PBANKA_093070) mittels ClustalW verglichen. Die zu Pf15 identischen AS wurden grau hinterlegt. Zusätzlich wurden das Signalpeptid orange und die vorhergesagten Transmembrandomänen grün unterstrichen.

Wie bereits beschrieben wird durch das Vorhandensein mehrerer Invasionswege die Impfstoffentwicklung gegen Malaria erschwert und es wird davon ausgegangen, dass eine effektive Vakzine sich nicht nur gegen eine Zielstruktur des Parasiten richten muss, sondern gegen mehrere gleichzeitig. Pf15 ist ein möglicher Kandidat für eine solche kombinierte Vakzine. Die Inhibition der Invasion sowohl durch die Pf15-spezifischen Antikörper, als auch durch rekombinant hergestelltes Pf15N unterstützen die These, dass Pf15 am Invasionsprozess der Merozoiten in die Erythrocyten beteiligt ist. Die Bindung von Pf15N an humane Erythrocyten ist ein Indiz dafür, dass es eine direkte, reversible Interaktion zwischen dem nativen Protein auf der Merozoitenoberfläche und den Erythrocyten geben kann. Es ist deshalb anzunehmen, dass Pf15 vor allem bei der initialen Anlagerung der Merozoiten an die RBC beteiligt ist. Auch die Verteilung von Pf15 auf der gesamten Oberfläche von Merozoiten ist ein Hinweis für diese Annahme, da der initiale Kontakt überall auf der Merozoitenoberfläche erfolgen kann. Aufgrund der Ergebnisse der Agglutinations-Assays mit Pronase- und Proteinase K-behandelten RBC handelt es sich mutmaßlich um eine auf Proteinen oder Zuckern basierende Interaktion, die möglicherweise durch elektrostatische Anziehung zwischen der negativ geladenen Erythrocytenoberfläche und dem positiv geladenen Pf15 unterstützt wird. Pf15 ist

innerhalb der Gattung *Plasmodium* konserviert. Aufgrund der hohen Konservierung des N-Terminus von Pf15 insbesondere innerhalb der humanpathogenen Arten, wäre es möglich, dass Pf15 nicht nur am initialen Kontakt an die Wirtszellen beteiligt ist sondern auch für die spezifische Erkennung humaner Erythrocyten wichtig ist.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, J.H., Blair, P.L., Kaneko, O., Peterson, D.S., 2001. An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. Trends in Parasitology 17, 297-9.
- Aikawa, M., Miller, L.H., Johnson, J., Rabbege, J., 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. The Journal of Cell Biology 77, 72-82.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2004. Molekularbiologie der Zelle, 4.Auflage. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Alonso, P.L., Sacarlal, J., Aponte, J.J., Leach, A., Macete, E., Aide, P., Sigauque, B., Milman, J., Mandomando, I., Bassat, Q., 2005. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. The Lancet 366, 2012-18.
- Ballou, W.R., Cahill, C.P., 2007. Two decades of commitment to malaria vaccine development: GlaxoSmithKline Biologicals. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77, 289-95.
- Bannister, L.H., Butcher, G.A., Dennis, E.D., Mitchell, G.H., 1975. Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoites *in vitro*. Parasitology 71, 483-91.
- Bannister, L.H., Mitchell, G.H., Butcher, G.A., Dennis, E.D., 1986a. Lamellar membranes associated with rhoptries in erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*: a clue to the mechanism of invasion. Parasitology 92, 291-303.
- Bannister, L.H., Mitchell, G.H., Butcher, G.A., Dennis, E.D., Cohen, S., 1986b. Structure and development of the surface coat of erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*. Cell and Tissue Research 245, 281-90.
- Bannister, L.H., Mitchell, G.H., 1989. The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion. The Journal of Protozoology 36, 362-7.
- Bannister, L.H., Dluzewski, A.R., 1990. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. Blood Cells 16, 257-97.
- Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S., Mitchell, G.H., 2000. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. Parasitology Today 16, 427-33.
- Bannister, L.H., Mitchell, G., 2003. The ins, outs and roundabouts of malaria. Trends in Parasitology 19, 209-13.

- Barnwell, J.W., Nichols, M.E., Rubinstein, P., 1989. *In vitro* evaluation of the role of the duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. Journal of Cellular Biochemistry 169, 1795-802.
- Baruch, D.I., Gormely, J.A., Ma, C., Howard, R.J., Pasloske, B.L., 1996. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 3497-502.
- Bates, A.H., Mu, J., Jiang, H., Fairhurst, R.M., Su, X.Z., 2010. Use of magnetically purified *Plasmodium falciparum* parasites improves the accuracy of erythrocyte invasion assays. Experimental Parasitology 5-7.
- Bergmann-Leitner, E.S., Duncan, E.H., Angov, E., 2009. MSP-1p42-specific antibodies affect growth and development of intra-erythrocytic parasites of *Plasmodium falciparum*. Malaria Journal 8, 1-12.
- Black, C.G., Wu, T., Wang, L., Hibbs, A.R., Coppel, R.L., 2001. Merozoite surface protein 8 of *Plasmodium falciparum* contains two epidermal growth factor-like domains. Molecular and Biochemical Parasitology 114, 217-26.
- Black, C., Wang, L., Wu, T., Coppel, R.L., 2003. Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. Molecular and Biochemical Parasitology 127, 59-68.
- Blackman, M.J., Heidrich, H.G., Donachie, S., McBride, J.S., Holder, A.A., 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. The Journal of Experimental Medicine 172, 379-82.
- Blackman, M.J., Ling, I.T., Nicholls, S.C., Holder, A.A., 1991a. Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. Molecular and Biochemical Parasitology 49, 29-34.
- Blackman, M.J., Whittle, H., Holder, A.A., 1991b. Processing of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. Molecular and Biochemical Parasitology 49, 35-44.
- Blackman, M.J., Scott-finnigan, T.J., Shai, S., Holder, A.A., 1994. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. The Journal of Experimental Medicine 180, 389-93.

- Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J., DeRisi, J.L., 2003. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology* 1, 85-100.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-54.
- Camus, D., Hadley, T.J., 1985. A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science* 230, 553-6.
- Celada, A., Cruchaud, A., Perrin, L.H., 1982. Opsonic activity of human immune serum on *in vitro* phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by monocytes. *Clinical and Experimental Immunology* 47, 635-44.
- Chalaris, A., Gewiese, J., Paliga, K., Fleig, L., Schneede, A., Krieger, K., Rose-John, S., Scheller, J., 2010. ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803, 234-45.
- Chitnis, C.E., Miller, L.H., 1994. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *Journal of Experimental Medicine* 180, 497-506.
- Clyde, D.F., McCarthy, V.C., Miller, R.M., Hornick, R.B., 1973. Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria. *The American Journal of the Medical Sciences* 266, 398-403.
- Cooper, J.A., Ingram, L.T., Bushell, G.R., Fardoulis, C.A., Stenzel, D., Schofield, L., Saul, A.J., 1988. The 140/130/105 kilodalton protein complex in the rhoptries of *Plasmodium falciparum* consists of discrete polypeptides. *PloS One* 29, 251-60.
- Cortés, A., 2008. Switching *Plasmodium falciparum* genes on and off for erythrocyte invasion. *Trends in Parasitology* 24, 517-24.
- Cosloy, S.D., Oishi, M., 1973. Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 84-7.
- Cowman, A.F., Crabb, B.S., 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124, 755-66.
- Cox-Singh, J., Singh, B., 2010. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends in Parasitology* 24, 406-10.
- Crabb, B.S., Rug, M., Gilberger, T.W., Thompson, J.K., Triglia, T., Maier, A.G., Cowman, A.F., 2004. Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods in Molecular Biology* 270, 263-76.

- Crompton, P.D., Pierce, S.K., Miller, L.H., 2010. Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of Clinical Investigations* 120, 4168-78.
- Culvenor, J.G., Day, K.P., Anders, R.F., 1991. *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infection and Immunity* 59, 1183-7.
- Daly, T.M., Long, C.A., 1993. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infection and Immunity* 61, 2462-7.
- Davies, D.H., Liang, X., Hernandez, J.E., Randall, A., Hirst, S., Mu, Y., Romero, K.M., Nguyen, T.T., Kalantari-Dehaghi, M., Crotty, S., Baldi, P., Villarreal, L.P., Felgner, P.L., 2005. Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 547-52.
- Deans, J.A., Alderson, T., Thomas, A.W., Mitchell, G.H., Lennox, E.S., Cohen, S., 1982. Rat monoclonal antibodies which inhibit the *in vitro* multiplication of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical and Experimental Immunology* 49, 297-309.
- Deitsch, K.W., Wellems, T.E., 1996. Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 76, 1-10.
- Dingwall, C., Laskey, R.A., 1991. Nuclear targeting sequences — a consensus? *Trends in Biochemical Sciences* 16, 478-81.
- Dolan, S.A., Miller, L.H., Wellems, T.E., 1990. Evidence for a switching mechanism in the invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Clinical Investigations* 86, 618-24.
- Dolan, S.A., Proctor, J.L., Alling, D.W., Okubo, Y., Wellems, T.E., Miller, L.H., 1994. Glycophorin B as an EBA-175 independent *Plasmodium falciparum* receptor of human erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 64, 55-63.
- Dondorp, A.M., Yeung, S., White, L., Nguon, C., Day, N.P., Socheat, D., von Seidlein, L., 2010. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nature Reviews. Microbiology* 8, 272-80.
- van Dooren, G.G., Marti, M., Tonkin, C.J., Stimmler, L.M., Cowman, A.F., McFadden, G.I., 2005. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* 57, 405-19.

- Duraisingh, M.T., Triglia, T., Ralph, S.A., Rayner, J.C., Barnwell, J.W., McFadden, G.I., Cowman, A.F., 2003. Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *The EMBO Journal* 22, 1047-57.
- Duraisingh, M.T., Cowman, A.F., 2005. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Tropica* 94, 181-90.
- Dvorak, J.A., Miller, L.H., 1975. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* 187, 748-50.
- Dvorin, J.D., Martyn, D.C., Patel, S.D., Grimley, J.S., Collins, C.R., Hopp, C.S., Bright, A.T., Westenberger, S., Winzeler, E., Blackman, M.J., Baker, D. a, Wandless, T.J., Duraisingh, M.T., 2010. A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science* 328, 910-2.
- Ejigiri, I., Sinnis, P., 2009. Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Current Opinion in Microbiology* 12, 401-7.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* 2, 953-71.
- Evers, A., Heppner, S., Leippe, M., Gelhaus, C., 2008. An efficient fluorimetric method to measure the viability of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Biological Chemistry* 389, 1523-5.
- Fankhauser, N., Mäser, P., 2005. Identification of GPI anchor attachment signals by a kohonen self-organizing map. *Bioinformatics* 21, 1846-52.
- Field, S.J., Pinder, J.C., Clough, B., Dluzewski, A.R., Wilson, R.J.M., Gratzer, W.B., 1993. Actin in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 25, 43-8.
- Fowkes, F.J.I., Richards, J.S., Simpson, J.A., Beeson, J.G., 2010. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine* 7, 1-20.
- Fowler, R.E., Fookes, R.E., Lavin, F.M., Bannister, L.H., Mitchell, G.H., 1998. Microtubules in *Plasmodium falciparum* merozoites and their importance for invasion of erythrocytes. *Parasitology* 117, 425-33.
- Fraser, T.S., Kappe, S.H., Narum, D.L., VanBuskirk, K.M., Adams, J.H., 2001. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Molecular and Biochemical Parasitology* 117, 49-59.

- Fritsch, J., 2007. Analyse des Proteinrepertoires intraerythrocytärer Membranstrukturen des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*. Welch 1897. Dissertation.
- Galinski, M.R., Barnwell, J.W., 1996. *Plasmodium vivax*: merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitology Today* 12, 20-9.
- Garcia, Y., Puentes, A., Curtidor, H., Cifuentes, G., Reyes, C., Barreto, J., Moreno, A., Patarroyo, M.E., 2007. Identifying merozoite surface protein 4 and merozoite surface protein 7 *Plasmodium falciparum* protein family members specifically binding to human erythrocytes suggests a new malarial parasite-redundant survival mechanism. *Journal of medicinal chemistry* 50, 5665-75.
- García, J., Curtidor, H., Pinzón, C.G., Vanegas, M., Moreno, A., Patarroyo, M.E., 2009. Identification of conserved erythrocyte binding regions in members of the *Plasmodium falciparum* Cys6 lipid raft-associated protein family. *Vaccine* 27, 3953-62.
- Gaur, D., Storry, J.R., Reid, M.E., Barnwell, J.W., Miller, L.H., 2003. *Plasmodium falciparum* is able to invade erythrocytes through a trypsin-resistant pathway independent of glycophorin B. *Infection and Immunity* 71, 6742-6.
- Gaur, D., Mayer, D.C.G., Miller, L.H., 2004. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *International Journal for Parasitology* 34, 1413-29.
- Gaur, D., Singh, S., Singh, S., Jiang, L., Diouf, A., Miller, L.H., 2007. Recombinant *Plasmodium falciparum* reticulocyte homology protein 4 binds to erythrocytes and blocks invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17789-94.
- Gerold, P., Schofield, L., Blackman, M.J., Holder, A.A., Schwarz, R.T., 1996. Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 75, 131-43.
- Ghoneim, A., Kaneko, O., Tsuboi, T., Torii, M., 2007. The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries. *Parasitology International* 56, 31-43.
- Gilberger, T.W., Thompson, J.K., Triglia, T., Good, R.T., Duraisingh, M.T., Cowman, A.F., 2003. A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 14480-6.

- Gilson, P.R., Nebl, T., Vukcevic, D., Moritz, R.L., Sargeant, T., Speed, T.P., Schofield, L., Crabb, B.S., 2006. Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Proteomics* 5, 1286-99.
- Goel, V.K., Li, X., Chen, H., Liu, S.-C., Chishti, A.H., Oh, S.S., 2003. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5164-9.
- Greenwood, B.M., Bojang, K., Whitty, C.J.M., Targett, G.A.T., 2005. Malaria. *The Lancet* 365, 1487-98.
- Günther, K., Tummler, M., Arnold, H., Ridley, R., Goman, M., Scaife, J., Lingelbach, K., 1991. An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* 46, 149-57.
- Hadengue, A.L., Del-Pino, M., Simon, A., Levenson, J., 1998. Erythrocyte disaggregation shear stress, sialic acid, and cell aging in humans. *Hypertension* 32, 324-30.
- Hadley, T.J., Klotz, F.W., Pasvol, G., Haynes, J.D., McGinniss, M.H., Okubo, Y., Miller, L.H., 1987. Falciparum malaria parasites invade erythrocytes that lack glycophorin A and B (MkMk). Strain differences indicate receptor heterogeneity and two pathways for invasion. *The Journal of Clinical Investigations* 80, 1190-3.
- Harris, P.K., Yeoh, S., Dluzewski, A.R., O' Donnell, R.A., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L.H., Mitchell, G.H., Blackman, M.J., 2005. Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathogens* 1, 241-51.
- Healer, J., Crawford, S., Ralph, S., Mcfadden, G., Cowman, A.F., 2002. Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infection and Immunity* 70, 5751-8.
- Helmby, H., Cavelier, L., Pettersson, U., Wahlgren, M., 1993. Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface. *Infection and Immunity* 61, 284-8.
- Heukeshoven, J., Dernick, R., 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.
- Hiller, N.L., Akompong, T., Morrow, J.S., Holder, A.A., Haldar, K., 2003. Identification of a stomatin orthologue in vacuoles induced in human erythrocytes by malaria parasites. A role for microbial raft proteins in apicomplexan vacuole biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 48413-21.

- Hodder, A.N., Crewther, P.E., Matthew, M.L.S.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Anders, R.F., 1996. The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 29446-52.
- Hof, H., Dörris, R., 2009. *Medizinische Mikrobiologie: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Klinische Infektiologie, Hygiene*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Holder, A.A., Freeman, R.R., Uni, S., Aikawa, M., 1985. Isolation of a *Plasmodium falciparum* rhoptry protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* 14, 293-303.
- Holder, A., Blackman, M.J., Burghaus, P.A., Chappel, J.A., Ling, I.T., McCallum-Deighton, N., Shai, S., 1992. A malaria merozoite surface protein (MSP-1)-structure, processing and function. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87, 37-42.
- Howell, S.A., Well, I., Fleck, S.L., Kettleborough, C., Collins, C.R., Blackman, M.J., 2003. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 23890-8.
- Iyer, J., Grüner, A.C., Rénia, L., Snounou, G., Preiser, P.R., 2007. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. *Molecular Microbiology* 65, 231-49.
- Kaneko, O., Mu, J., Tsuboi, T., Su, X., Torii, M., 2002. Gene structure and expression of a *Plasmodium falciparum* 220-kDa protein homologous to the *Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology* 121, 275-8.
- Kang, D., Gho, Y.S., Suh, M., Kang, C., 2002. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Bulletin of the Korean Chemical Society* 23, 1511-2.
- Kappe, S., Buscaglia, C., Bergman, L.W., Coppens, I., Nussenzweig, V., 2004. Apicomplexan gliding motility and host cell invasion: overhauling the motor model. *Trends in Parasitology* 20, 13-16.
- Keeley, A., Soldati, D., 2004. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends in Cell Biology* 14, 528-32.
- Khattab, A., Bonow, I., Schreiber, N., Petter, M., Schmetz, C., Klinkert, M.Q., 2008. *Plasmodium falciparum* variant STEVOR antigens are expressed in merozoites and possibly associated with erythrocyte invasion. *Malaria Journal* 7, 1-11.
- Kilejian, A., 1979. Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4650-3.

- Klein, C., Garcia-Rizo, C., Bisle, B., Scheffer, B., Zischka, H., Pfeiffer, F., Siedler, F., Oesterhalt, D., 2005. The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics* 5, 180-97.
- Klemba, M., Gluzman, I., Goldberg, D.E., 2004. A *Plasmodium falciparum* dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 43000-7.
- Knöckel, J., 2009. Die Vitamin B6-Biosynthese von *Plasmodium falciparum* – Interaktion von Pf Pdx1 und Pf Pdx2. Dissertation.
- Kumar, S., Yadava, A., Keister, D.B., Tian, J.H., Ohl, M., Perdue-Greenfield, K.A., Miller, L.H., Kaslow, D.C., 1995. Immunogenicity and *in vivo* efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys. *Molecular Medicine* 1, 325-32.
- Kutner, S., Breuer, W.V., Ginsburg, H., Aley, S.B., Cabantchik, Z.I., 1985. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development. *Journal of Cellular Physiology* 125, 521-7.
- Kwiatkowski, D., Cannon, J.G., Manogue, K.R., Cerami, A., Dinarello, C.A., Greenwood, B.M., 1989. Tumour necrosis factor production in Falciparum malaria and its association with schizont rupture. *Clinical and Experimental Immunology* 77, 361-6.
- Kyes, S., Pinches, R., Newbold, C., 2000. A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 105, 311-5.
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157, 105-32.
- Külzer, S., Gehde, N., Przyborski, J.M., 2009. Return to sender: use of Plasmodium ER retrieval sequences to study protein transport in the infected erythrocyte and predict putative ER protein families. *Parasitology Research* 104, 1535-41.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lambros, C., Vanderberg, J.P., 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of Parasitology* 65, 418-20.
- Langreth, S.G., Jensen, J.B., Reese, R.T., Trager, W., 1978. Fine structure of human malaria *in vitro*. *The Journal of Protozoology* 25, 443-52.

- Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., De La Vega, P., Holder, A.A., Batalov, S., Carucci, D.J., Winzeler, E.A., 2003. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* 301, 1503-8.
- Li, X., Chen, H., Oo, T.H., Daly, T.M., Bergman, L.W., Liu, S.C., Chishti, A.H., Oh, S.S., 2004. A co-ligand complex anchors *Plasmodium falciparum* merozoites to the erythrocyte invasion receptor band 3. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 5765-71.
- Ling, I.T., Ogun, S.A., Holder, A., 1994. Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunology* 16, 63-7.
- Lingelbach, K., Joiner, K.A., 1998. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *Journal of Cell Science* 111, 1467-75.
- Llinás, M., Bozdech, Z., Wong, E.D., Adai, A.T., DeRisi, J.L., 2006. Comparative whole genome transcriptome analysis of three *Plasmodium falciparum* strains. *Nucleic Acids Research* 34, 1166-73.
- Lucius, R., Loos-Frank, B., 2008. *Biologie von Parasiten*, 2. Auflage. Springer-Verlag.
- López, R., Valbuena, J.J., Rodríguez, L.E., Ocampo, M., Vera, R., Curtidor, H., Puentes, A., García, J., Ramirez, L.E., Patarroyo, M., 2006. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 6 (MSP-6) derived peptides bind erythrocytes and partially inhibit parasite invasion. *Peptides* 27, 1685-92.
- Marsh, K., Kinyanjui, S., 2006. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunology* 28, 51-60.
- Marshall, V.M., Silva, A., Foley, M., Cranmer, S., Wang, L., McColl, D.J., Kemp, D.J., Coppel, R.L., 1997. A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain. *Infection and Immunity* 65, 4460-7.
- Marshall, V.M., Tieqiao, W., Coppel, R.L., 1998. Close linkage of three merozoite surface protein genes on chromosome 2 of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 94, 13-25.
- Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E., Cowman, A.F., 2004. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306, 1930-3.
- Maréchal, E., Cesbron-Delauw, M.F., 2001. The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends in Plant Science* 6, 200-5.

- Mazumdar, S., Mukherjee, P., Yazdani, S.S., Jain, S.K., Mohmmed, A., Chauhan, V.S., 2010. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1)-MSP-3 chimeric protein: immunogenicity determined with human-compatible adjuvants and induction of protective immune response. *Infection and Immunity* 78, 872-83.
- McBride, J.S., Heidrich, H.G., 1987. Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. *Molecular and Biochemical Parasitology* 23, 71-84.
- McCull, D.J., Anders, R.F., 1997. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Molecular and Biochemical Parasitology* 90, 21-31.
- Miller, L.H., Haynes, J.D., McAuliffe, F.M., Shiroshi, T., Durocher, J.R., McGinniss, M.H., 1977. Evidence for differences in erythrocyte surface receptors for the malarial parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*. *The Journal of Experimental Medicine* 146, 277-81.
- Miller, L.H., Mason, S.J., Dvorak, J.A., McGinniss, M.H., Rothman, I.K., 1975. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: duffy blood group determinants. *Science* 189, 561-3.
- Miller, L., Mason, S., Clyde, D., McGinniss, M., 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The duffy-blood-group genotype, FyFy. *The New England Journal of Medicine* 295, 302-4.
- Miller, L.H., Aikawa, M., Johnson, J.G., Shiroishi, T., 1979. Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. *Journal of Experimental Medicine* 149, 172-84.
- Miller, L.H., David, P.H., Hudson, D.E., Hadley, T.J., Richards, R.L., Aikawa, M., 1984. Monoclonal antibodies to a 140,000-m.w. protein on *Plasmodium knowlesi* merozoites inhibit their invasion of rhesus erythrocytes. *Journal of Immunology* 132, 438-42.
- Mitchell, G.H., Hadley, T.J., McGinniss, M.H., Klotz, F.W., Miller, H., 1986. Invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum* malaria parasites: evidence for receptor heterogeneity and two receptors. *Blood* 67, 1519-21.
- Mitchell, G.H., Thomas, A.W., Margos, G., Dluzewski, A.R., Bannister, L.H., 2004. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infection and Immunity* 72, 154-58.

- Mongui, A., Angel, D.I., Guzman, C., Vanegas, M., Patarroyo, M.A., 2008. Characterisation of the *Plasmodium vivax* Pv38 antigen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376, 326-30.
- Morrisette, N.S., Sibley, L.D., 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 21-38.
- Moura, P. a, Dame, J.B., Fidock, D.A., 2009. Role of *Plasmodium falciparum* digestive vacuole plasmepsins in the specificity and antimalarial mode of action of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 4968-78.
- Müller, I.B., Wu, F., Bergmann, B., Knöckel, J., Walter, R.D., Gehring, H., Wrenger, C., 2009. Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PloS One* 4, 1-9.
- N' Guessan, R., Corbel, V., Akogbéto, M., Rowland, M., 2007. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerging Infectious Diseases* 13, 199-206.
- Obando-Martinez, A.Z., Curtidor, H., Vanegas, M., Arévalo-Pinzón, G., Patarroyo, M.A., Patarroyo, M.E., 2010. Conserved regions from *Plasmodium falciparum* MSP11 specifically interact with host cells and have a potential role during merozoite invasion of red blood cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 110, 882-92.
- Ocampo, M., Curtidor, H., Vera, R., Valbuena, J.J., Rodríguez, L.E., Puentes, A., López, R., García, J.E., Tovar, D., Pacheco, P., Navarro, M.A., Patarroyo, M.E., 2004. MAEBL *Plasmodium falciparum* protein peptides bind specifically to erythrocytes and inhibit *in vitro* merozoite invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315, 319-29.
- Ogutu, B.R., Apollo, O.J., McKinney, D., Okoth, W., Siangla, J., Dubovsky, F., Tucker, K., Waitumbi, J.N., Diggs, C., Wittes, J., Malkin, E., Leach, A., Soisson, L.A., Milman, J.B., Otieno, L., Holland, C.A., Polhemus, M., Remich, S.A., Ockenhouse, C.F., Cohen, J., Ballou, W.R., Martin, S.K., Angov, E., Stewart, V.A., Lyon, J.A., Heppner, D.G., Withers, M.R., 2009. Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PloS One* 4, 1-11.
- Oh, S.S., Chishti, A.H., 2005. Host receptors in malaria merozoite invasion. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 295, 203-32.

- O' Donnell, R.A., de Koning-Ward, T.F., Burt, R.A., Bockarie, M., Reeder, J.C., Cowman, A.F., Crabb, B.S., 2001. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *The Journal of Experimental Medicine* 193, 1403-12.
- O' Donnell, R.A., Blackman, M.J., 2005. The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion. *Current Opinion in Microbiology* 8, 422-7.
- Pachebat, J.A., Ling, I.T., Grainger, M., Trucco, C., Holder, A.A., 2001. The 22 kDa component of the protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites is derived from a larger precursor, merozoite surface protein 7. *Molecular and Biochemical Parasitology* 117, 83-9.
- Pasvol, G., Wainscoat, J.S., Weatherall, D.J., 1982. Erythrocytes deficiency in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 297, 64-6.
- Peterson, D.S., Miller, L.H., Wellems, T.E., 1995. Isolation of multiple sequences from the *Plasmodium falciparum* genome that encode conserved domains homologous to those in erythrocyte-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7100-4.
- Phillips, R.E., Looareesuwan, S., Warrell, D.A., Lee, S.H., Karbwang, J., Warrell, M.J., White, N.J., Swasdichai, C., Weatherall, D.J., 1986. The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *The Quarterly Journal of Medicine* 58, 305-23.
- Pinder, J.C., Fowler, R.E., Dluzewski, A.R., Bannister, L.H., Lavin, F.M., Mitchell, G.H., Wilson, R.J., Gratzer, W.B., 1998. Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *Journal of Cell Science* 111, 1831-9.
- Preiser, P.R., Khan, S., Costa, F.T.M., Jarra, W., Belnoue, E., Ogun, S., Holder, A.A., Voza, T., Landau, I., Snounou, G., Rénia, L., 2002. Stage-specific transcription of distinct repertoires of a multigene family during *Plasmodium* life cycle. *Science* 295, 342-5.
- Ramasamy, R., Rajakaruna, R., 1997. Association of malaria with inactivation of alpha1,3-galactosyl transferase in catarrhines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1360, 241-6.
- Ramasamy, R., Ramasamy, M., Yasawardena, S., 2001. Antibodies and *Plasmodium falciparum* merozoites. *Trends in Parasitology* 17, 194-7.
- Rankin, K.E., Graewe, S., Heussler, V.T., Stanway, R.R., 2010. Imaging liver-stage malaria parasites. *Cellular Microbiology* 12, 569-79.

- Ray, P., Sahoo, N., Singh, B., Kironde, F.A., 1994. Serum antibody immunoglobulin G of mice convalescent from *Plasmodium yoelii* infection inhibits growth of *Plasmodium falciparum* *in vitro*: blood stage antigens of *P. falciparum* involved in interspecies cross-reactive inhibition of parasite growth. *Infection and Immunity* 62, 2354-61.
- Rayner, J.C., Galinski, M.R., Ingravallo, P., Barnwell, J.W., 2000. Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9648-53.
- Rayner, J.C., Vargas-Serrato, E., Huber, C.S., Galinski, M.R., Barnwell, J.W., 2001. A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *The Journal of Experimental Medicine* 194, 1571-81.
- Rodriguez, L.E., Curtidor, H., Ocampo, M., Garcia, J., Puentes, A., Valbuena, J., Vera, R., López, R., Patarroyo, M.E., 2005. Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 3 (MSP3) protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit merozoite invasion. *Protein Science* 3, 1778-86.
- Rug, M., Wickham, M.E., Foley, M., Cowman, A.F., Tilley, L., 2004. Correct promoter control is needed for trafficking of the ring-infected erythrocyte surface antigen to the host cytosol in transfected malaria parasites. *Infection and Immunity* 72, 6095-105.
- Sabbatani, S., Fiorino, S., Manfredi, R., 2010. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 14, 299-309.
- Sabchareon, A., Burnouf, T., Ouattara, D., Attanath, P., Bouharoun-Tayoun, H., Chantavanich, P., Foucoult, C., Chongsuphajaisiddhi, T., Druilhe, P., 1991. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45, 297-308.
- Sacarlal, J., Aide, P., Aponte, J.J., Renom, M., Leach, A., Mandomando, I., Lievens, M., Bassat, Q., Lafuente, S., Macete, E., Vekemans, J., Guinovart, C., Sigauque, B., Sillman, M., Milman, J., Dubois, M.C., Demoitié, M.A., Thonnard, J., Menéndez, C., Ballou, W.R., Cohen, J., Alonso, P.L., 2009. Long-term safety and efficacy of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children. *The Journal of Infectious Diseases* 200, 329-36.
- Sachs, J., Malaney, P., 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature* 415, 680-5.

- Sagara, I., Dicko, A., Ellis, R.D., Fay, M.P., Diawara, S.I., Assadou, M.H., Sissoko, M.S., Kone, M., Diallo, A.I., Saye, R., Guindo, M.A., Kante, O., Niamele, M.B., Miura, K., Mullen, G.E.D., Pierce, M., Martin, L.B., Dolo, A., Diallo, D.A., Doumbo, O.K., Miller, L.H., Saul, A., 2009. A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. *Vaccine* 27, 3090-8.
- Sam-Yellowe, T.Y., Shio, H., Perkins, M.E., 1988. Secretion of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes. *The Journal of Cell Biology* 106, 1507-13.
- Sam-Yellowe, T.Y., Perkins, M.E., 1991. Interaction of the 140/130/110 kDa rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* with the erythrocyte membrane and liposomes. *Experimental Parasitology* 73, 161-71.
- Sanders, P.R., Gilson, P.R., Cantin, G.T., Greenbaum, D.C., Nebl, T., Carucci, D.J., McConville, M.J., Schofield, L., Hodder, A.N., Yates, J.R., Crabb, B.S., 2005. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 40169-76.
- Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud, T., 2000. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 21, 1054-70.
- Saridaki, T., Fröhlich, K.S., Braun-Breton, C., Lanzer, M., 2009. Export of PfSBP1 to the *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts. *Traffic* 10, 137-52.
- Saul, A., 1987. Kinetic constraints on the development of a malaria vaccine. *Parasite Immunology* 9, 1-9.
- Schofield, L., Hewitt, M.C., Evans, K., Siomos, A., Seeberger, P.H., 2002. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature* 418, 785-9.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-79.
- Shenai, B.R., Sijwali, P.S., Singh, A., Rosenthal, P.J., 2000. Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 29000-10.

- Singh, S., Kennedy, M.C., Long, C.A., Saul, A.J., Miller, L.H., Stowers, A.W., 2003. Biochemical and immunological characterization of bacterially expressed and refolded *Plasmodium falciparum* 42-Kilodalton C-terminal merozoite surface protein 1. *Infection and Immunity* 71, 6766-74.
- Spitalny, G.L., Nussenzweig, R.S., 1973. *Plasmodium berghei*: relationship between protective immunity and anti-sporozoite (CSP) antibody in mice. *Experimental Parasitology* 33, 168-78.
- Stahl, H.D., Bianco, A.E., Crewther, P.E., Anders, R.F., Kyne, A.P., Coppel, R.L., Mitchell, G.F., Kemp, D.J., Brown, G.V., 1986. Sorting large numbers of clones expressing *Plasmodium falciparum* antigens in *Escherichia coli* by differential antibody screening. *Molecular Biology and Medicine* 3, 351-68.
- Stanley, H.A., Reese, R.T., 1984. *In vitro* inhibition of intracellular growth of *Plasmodium falciparum* by immune sera. *The American Journal of the Medical Sciences* 33, 12-6.
- Szarfman, A., Lyon, J.A., Walliker, D., Quakyi, I., Howard, R.J., Sun, S., Ballou, W.R., Esser, K., London, W.T., Wirtz, R., 1988a. Mature liver stages of cloned *Plasmodium falciparum* share epitopes with proteins from sporozoites and asexual blood stages. *Parasite Immunology* 10, 339-51.
- Szarfman, A., Walliker, D., McBride, J.S., Lyon, J.A., Quakyi, I.A., Carter, R., 1988b. Allelic forms of gp195, a major blood-stage antigen of *Plasmodium falciparum*, are expressed in liver stages. *Journal of Experimental Medicine* 167, 231-6.
- Taverne, J., Bate, C.A., Kwiatkowski, D., Jakobsen, P.H., Playfair, J.H., 1990. Two soluble antigens of *Plasmodium falciparum* induce tumor necrosis factor release from macrophages. *Infection and Immunity* 58, 2923-8.
- Telen, M.J., 2000. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. *Seminars in Hematology* 37, 130-42.
- Thompson, J.K., Triglia, T., Reed, M.B., Cowman, A.F., 2001. A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. *Molecular Microbiology* 41, 47-58.
- Titanji, V.P.K., Amambua-Ngwa, A., Anong, D.N., Mbandi, S.K., Tangie, E., Tening, I., Yengo, R., 2009. Isolation and expression of UB05, a *Plasmodium falciparum* antigen recognised by antibodies from semi-immune adults in a high transmission endemic area of the Cameroonian rainforest. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47, 1147-58.

- Torii, M., Adams, J.H., Miller, L.H., Aikawa, M., 1989. Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infection and Immunity* 57, 3230-3.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4.
- Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-5.
- Treck, M., Struck, N.S., Haase, S., Langer, C., Herrmann, S., Healer, J., Cowman, A.F., Gilberger, T.W., 2006. A conserved region in the EBL proteins is implicated in microneme targeting of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 31995-2003.
- Treck, M., Zacherl, S., Herrmann, S., Cabrera, A., Kono, M., Struck, N.S., Engelberg, K., Haase, S., Frischknecht, F., Miura, K., Spielmann, T., Gilberger, T.W., 2009. Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. *PLoS Pathogens* 5, 1-13.
- Triglia, T., Healer, J., Caruana, S.R., Hodder, A.N., Anders, R.F., Crabb, B.S., Cowman, A.F., 2000. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Molecular Microbiology* 38, 706-18.
- Trucco, C., Fernandez-Reyes, D., Howell, S., Stafford, W.H., Scott-Finnigan, T.J., Grainger, M., Ogun, S.A., Taylor, W.R., Holder, A.A., 2001. The merozoite surface protein 6 gene codes for a 36 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex. *Molecular and Biochemical Parasitology* 112, 91-101.
- Udeinya, I.J., Schmidt, J.A., Aikawa, M., Miller, L.H., Green, I., 1981. *Falciparum* malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. *Science* 213, 555-7.
- Urquiza, M., Rodriguez, L.E., Suarez, J.E., Guzmán, F., Ocampo, M., Curtidor, H., Segura, C., Trujillo, E., Patarroyo, M.E., 1996. Identification of *Plasmodium falciparum* MSP-1 peptides able to bind to human red blood cells. *Parasite Immunology* 18, 515-26.

- Vargas-Serrato, E., Barnwell, J.W., Ingravallo, P., Perler, F.B., Galinski, M.R., 2002. Merozoite surface protein-9 of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites is orthologous to p101/ABRA of *P. falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120, 41-52.
- Vaughan, A.M., Aly, A.S., Kappe, S.H., 2008. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: Gliding and Hiding. *Cell Host Microbe* 4, 209-18.
- Wahlgren, M., Carlson, J., Helmbj, H., Hedlund, I., Treutiger, C.J., 1992. Molecular mechanisms and biological importance of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87, 323-9.
- Waller, R.F., Reed, M.B., Cowman, A.F., McFadden, G.I., 2000. Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *The EMBO Journal* 19, 1794-802.
- Weatherall, D.J., Abdalla, S., 1982. The anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *British Medical Bulletin* 38, 147-51.
- Weber, J.L., Lyon, J.A., Wolff, R.H., Hall, T., Lowell, G.H., Chulay, J.D., 1988. Primary structure of a *Plasmodium falciparum* malaria antigen located at the merozoite surface and within the parasitophorous vacuole. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 11421-5.
- Wegierski, T., Steffl, D., Kopp, C., Tauber, R., Buchholz, B., Nitschke, R., Kuehn, E.W., Walz, G., Köttgen, M., 2009. TRPP2 channels regulate apoptosis through the Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal* 28, 490-499.
- WHO, 2010. World Malaria Report 2010.
- Wickham, M.E., Rug, M., Ralph, S.A., Klonis, N., Mcfadden, G.I., Tilley, L., Cowman, A.F., 2001. Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *The EMBO Journal* 20, 5636-49.
- Wickramarachchi, T., Cabrera, A.L., Sinha, D., Dhawan, S., Chandran, T., Devi, Y.S., Kono, M., Spielmann, T., Gilberger, T.W., Chauhan, V.S., Mohammed, A., 2009. A novel *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein associated with the merozoite surface, PfDBLMSP. *International Journal for Parasitology* 39, 763-73.
- Woehlbier, U., Epp, C., Hackett, F., Blackman, M.J., Bujard, H., 2010. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. *Malaria Journal* 9, 1-12.

7 Zusammenfassung

Malaria wird durch einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht. Die asexuelle Vermehrung des Parasiten in den Erythrocyten (RBC) ist verantwortlich für die Symptomatik der Krankheit. Die Entwicklung einer effizienten Malaria-Vakzine, insbesondere gegen eine Infektion mit *Plasmodium falciparum*, ist eines der Hauptziele der Malariaforschung. Die hohe genetische Variabilität und das Vorhandensein alternativer Invasionswege führen zu der Hypothese, dass nur eine kombinierte Vakzine, die sich gegen mehrere Zielstrukturen im Parasiten richtet, einen effektiven Schutz bieten kann. Deshalb ist es sinnvoll, besonders die erythrocytären Stadien des Malariaerregers zu erforschen. Gerade die invasiven Stadien sind interessant, denn ihre Invasions-Effektivität korreliert direkt mit der Parasitämie und dem Krankheitsverlauf der Malaria. Sie sind außerdem die einzigen Stadien, die während der erythrocytären Entwicklung extrazellulär dem Immunsystem des Menschen ausgesetzt sind. Insbesondere die Proteine, die auf der Merozoitenoberfläche lokalisiert sind oder die von den Organellen des Apikalkomplexes sezerniert werden, spielen eine wichtige Rolle während der Invasion der Merozoiten.

Es wurden in dieser Arbeit vier Merozoitenproteine aus *P. falciparum* untersucht, die in Merozoitenmembranpräparationen massenspektrometrisch oder mit Hilfe von Antikörpern immunologisch nachgewiesen wurden. Es handelte sich dabei um die Proteine Pf14, Pf15, Pf117 und Pf38. Pf38 wurde Immunfluoreszenz-mikroskopisch vor allem in den Rhoptrien nachgewiesen, wohingegen es sich bei den anderen dreien um Merozoitenoberflächenmoleküle handelte. Dies wurde im Falle von Pf14 und Pf15 zusätzlich mit Hilfe von transgenen *P. falciparum*-Parasiten, die die zu untersuchenden Proteine als GFP-Fusionsproteine exprimierten, bestätigt. Die Analyse der Expression der Zielproteine zeigte, dass sich die Proteine vor allem in den späten Stadien anreichern, was auf eine Funktion in den Schizonten oder Merozoiten hinweist. Viabilitäts-Assays mit den spezifischen Antikörpern ließen keinen Effekt auf die Replikation und die intrazelluläre Entwicklung der Parasiten erkennen. Auch die Antikörper-basierten Invasions-Assays zeigten für drei der vier Proteine keine Invasionsinhibition. Die Antikörper gegen Pf15 jedoch führten zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Reduktion der Parasitämie. Dadurch dass mikroskopisch keine Restschizonten zu sehen waren, wurde eine Wirkung der Antikörper auf die Freisetzung der Merozoiten ausgeschlossen. Durch spezifische Blockierung der Antikörper mit den Immunisierungspeptiden, wurde die Inhibition

aufgehoben, was bewies, dass die Hemmung ausschließlich durch die Pf15-spezifischen IgG verursacht wurde. Außerdem wurde gezeigt, dass nur die Antikörper, die gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet waren, die Inhibition der Invasion auslösten. Die rekombinante Expression des N-Terminus von Pf15 (Pf15N) in löslicher Form ermöglichte die Durchführung eines Peptid-basierten Invasions-Assays, der ebenfalls zu einer Inhibition der Invasion führte. Im Bindungs-Assay wurde gezeigt, dass Pf15N nichtkovalent an humane Erythrocyten bindet. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Pf15N zu einer Agglutination von Erythrocyten führte. *Mock*-Peptide, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung, jedoch nicht in der Primärstruktur, zu Pf15N identisch waren, zeigten als Kontrollen in den funktionalen Assays weder eine Bindung an RBC, noch eine Hemmung der Invasion oder die Agglutination der RBC. Folglich ist der Effekt von Pf15N auf Invasion und RBC sequenzspezifisch. Die Verwendung Pronase- und Proteinase K-behandelter RBC im Agglutinations-Assay führte zu einer Erhöhung der Pf15N-Konzentration, die für die Agglutination der RBC nötig war. Die Ergebnisse der Invasions-, Bindungs- und Agglutinations-Assays unterstützen die Theorie, dass Pf15 eine Rolle während der Invasion der Merozoiten in die Erythrocyten spielt. Sie lassen vermuten, dass Pf15 an der Anlagerung der Merozoiten an die Erythrocyten beteiligt ist. Die Konservierung des N-Terminus von Pf15, insbesondere innerhalb der humanpathogenen *Plasmodium*-Arten, lässt vermuten, dass Pf15 während des initialen Kontaktes auch an der Erkennung humaner Erythrocyten beteiligt ist.

8 Summary

Malaria is caused by a unicellular parasite of the genus *Plasmodium*. The asexual reproduction in erythrocytes (RBC) is the base of the clinical symptoms of the infection. One major goal is the development of an effective malaria vaccine, especially against infection with *Plasmodium falciparum*. The genetic variety and the discovery of alternative invasion pathways lead to the assumption that solely a combined vaccine against multiple parasite targets has the ability for effective protection. For that reason it is important to explore the erythrocytic development of the parasites. Merozoites are the invasive stages of the erythrocytic cycle. Their invasion efficiency correlates with the parasitemia and the course of disease. Additionally, they are the only stages during the asexual cycle, which are extracellularly exposed to human immune system. Proteins expressed on the merozoite surface and those secreted from its apical secretory organelles play an essential role during invasion processes.

In this work, four merozoite proteins were examined. They were named Pf14, Pf15, Pf38 and Pf117 and were identified via mass spectrometry and with western blot analysis with protein-specific antisera. In immunofluorescence experiments, Pf38 was detected in rhoptries, whereas the other three proteins were localized to the merozoite surface. Pf14 and Pf15 were additionally detected in the merozoite plasmamembrane in GFP expressing transgenic parasites. The analysis of the stage specific expression during the erythrocytic cycle revealed a late-staged protein expression for all of the proteins analysed. The accumulation of the proteins in schizonts indicates a functional role in schizonts or merozoites. Viability assays showed no effect on intracellular survival and development of the parasite. Also the invasion assays showed for three of the proteins no antibody-mediated effect on rupture or invasion. Solely the addition of antibodies against Pf15 resulted in a dose-dependent decrease of parasitemia. The absence of arrested schizonts excludes antibody-mediated inhibition of merozoite release. The specific blocking of antibodies with immunization peptides annihilated the invasion inhibition proving only Pf15-specific antibodies to cause inhibition. Furthermore, it was shown that antibodies directed against the N-terminus of Pf15 in particular produced blocking of invasion. The N-terminus of Pf15 (Pf15N) was recombinantly synthesized in bacteria. In binding assay it was shown that Pf15N is supposed to bind reversibly to erythrocytes. It became also apparent that Pf15N caused agglutination of erythrocytes. Mock peptides with identical amino acid composition, but with different primary structure to Pf15N were used

as controls in functional assays. They neither bound to RBC nor caused invasion inhibition or agglutination of RBC. Therefore the effects of Pf15N on invasion and RBC are presumably sequence specific. Assays with pronase- and proteinase K-treated RBC raised the minimum concentration of Pf15N for detectable agglutination. The results of the invasion, binding and agglutination assays suggest that Pf15 plays a role during merozoite invasion, in particular for initial contact. Additionally, the conservation of the N-terminus of Pf15 in *Plasmodium* species, which are human pathogen, leads to the assumption that Pf15 is also relevant for recognition of human erythrocytes during the initial attachment.

Danksagung

Prof. Dr. Matthias Leippe danke ich für die Vergabe dieses interessanten Dissertationsthemas und die wissenschaftlichen Anregungen während der letzten Jahre.

Prof. Dr. Paul Saftig möchte ich für die Erstellung des Zweitgutachtens danken.

Weiterer Dank gilt auch Dr. Christoph Gelhaus für die Betreuung meiner Arbeit und die motivierenden Worte zwischen den Zeilen.

Für die Generierung der GFP-Parasiten und die kurzzeitige Aufnahme in ihr Labor, möchte ich mich bei Dr. Ingrid Müller und Dr. Carsten Wrenger vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Andreas Tholey und Dr. Thorsten Overrath vom Institut für Experimentelle Medizin für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Ein Dankeschön auch an Dr. Jürgen Fritsch für die geleisteten Vorarbeiten.

Weiterer Dank gilt Dr. Jürgen Scheller und Christoph Garbers für die Überlassung der eukaryontischen Expressionsvektoren.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle Mitarbeiter der Zoophysiologie für das kollegiale und meist fröhliche Arbeitsklima. Insbesondere bei Heidrun Liesegang und Stephan Philipp möchte ich mich für den gemeinsamen Kampf gegen Malaria in Kiel bedanken.

Meiner Familie danke ich für die immerwährende Unterstützung.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit Hilfe der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Anleitung meiner akademischen Lehrer verfasst habe. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Kiel, im März 2011

Saskia Viebig

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Saskia Viebig, geb. Heppner
Geburtsdatum:	15. April 1983
Geburtsort:	Kiel
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Hochschulausbildung

September 2007- Mai 2011	Doktorarbeit an der CAU Kiel, Institut für Zoologie, Zoophysiologie, bei Prof. Dr. Matthias Leippe
Dezember 2006- Juli 2007	Diplomarbeit an der CAU Kiel, Institut für Zoologie, Zoophysiologie, bei Prof. Dr. Matthias Leippe
Oktober 2002- Juli 2007	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Studiengang: Biologie

Schulbildung

August 1993- Juni 2002	Gymnasium Wellingdorf, Kiel
August 1989- Juli 1993	Grundschule Schönkirchen, Schönkirchen