

Herstellung genetisch attenuierter Plasmodien zur Vakzinierung:

Neue Ansätze zur Blockierung der Parasitenentwicklung in der späten Leberphase

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften des Departments Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, der Universität Hamburg (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von Andreas Nagel aus Lüneburg

Hamburg, 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Prof. Dr. V. HEUSSLER Weitere Gutachterin der Dissertation: Prof. Dr. I. BRUCHHAUS Tag der Disputation: 02. Dezember 2011

Hamburg, den 18. November 2011

Professor Dr. J. Fromm Vorsitzender des Promotionsausschusses Biologie Die Betreuung der vorliegenden Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. Volker T. Heussler übernommen. Die experimentellen Arbeiten wurden von Juli 2008 bis Juni 2011 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Sektion Parasitologie, in der Arbeitsgruppe Malaria in Hamburg durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Volker T. Heussler, Sektion Parasitologie, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Bernhard-Nocht-Str. 74, 20359 Hamburg

Gutachterin: Prof. Dr. Iris Bruchhaus, Sektion Parasitologie, Bernhard-Nocht-Institut

für Tropenmedizin, Bernhard-Nocht-Str. 74, 20359 Hamburg

Zusammenfassung

Für die Bekämpfung der Malaria existiert bisher noch kein kommerziell erhältlicher Impfstoff. Wissenschaftliche Studien zeigen jedoch, dass durch eine Immunisierung mit genetisch attenuierten Parasiten, deren Entwicklung in der späten Leberphase arretiert, ein steriler, stadien- und speziesübergreifender Schutz gegen eine Infektion mit voll-virulenten Plasmodiumparasiten erreicht werden kann. Die Herstellung sicherer genetisch attenuierter Parasiten erfordert mindestens eine doppelte Attenuierung der Parasiten. Bisher wurde dies über die Entfernung von Genen, die für die Leberphasenentwicklung essentiell sind, erreicht. Die Auswahl hierfür in Frage kommender Gene ist, bedingt durch die bisher relativ wenig erforschte Leberphase von *Plasmodium*, jedoch begrenzt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein neuer Ansatz zur Herstellung doppelt genetisch attenuierter Parasiten verfolgt. Unter Verwendung einer stadienspezifischen Promotorregion erfolgte zunächst die Herstellung einer transgenen, einfach attenuierten Plasmodium berghei Parasitenlinie, die in der späten Leberphase das bakterielle porenformende Protein Perfringolysin O (PFO) als V5-Fusionsprotein exprimiert (PbPFO_{LS}). Die PFO::V5-Expression führte bei späten Schizonten zur vorzeitigen Lyse der parasitophoren Vakuolenmembran sowie der Parasitenplasmamembran. Infolgedessen kam es zu einer schnellen Freisetzung von Proteinen aus dem Parasiten- ins Wirtszellzytosol und letztlich zum Absterben der Parasiten. Mittels Immunfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass die Parasiten zu diesem Zeitpunkt bereits Proteine der späten Leberphase exprimierten, was exemplarisch anhand von SERA2-Proteinen untersucht wurde. Interessant und unerwartet war. dass es durch die vorzeitige Lyse der parasitophoren Vakuolenmembran nicht zum Absterben der Wirtszelle kam.

Erste Immunisierungsexperimente mit PbPFO_{LS}-Parasiten in Balb/c und C57BL/6 Mäusen konnten zeigen, dass die immunisierten Mäuse steril gegen eine Infektion mit voll-virulenten Sporozoiten geschützt waren. Jedoch kam es nach der Immunisierung vereinzelt zu einer Blutinfektion mit PbPFO_{LS}-Parasiten.

Um eine vollständige Attenuierung zu erreichen, wurden doppelt attenuierte Parasiten hergestellt. Hierzu wurde eine Parasitenlinie generiert, die die PFO::V5-Expression mit der Deletion des für die Leberphase essentiellen Pyruvatdehydrogenase-E1 α -Gens (pdh- $e1\alpha$) kombiniert (Pbpdhko-PFO_{LS}). Der Phänotyp der einfachen pdh- $e1\alpha$ -Gendeletion in P berghei wurde zuvor in einer hierfür hergestellten Parasitenlinie untersucht. Diese Charakterisierung ergab, dass die P. berghei pdh- $e1\alpha$ knockout

Parasiten, im Gegensatz zu bereits publizierten *P. yoelii pdh-e1α knockout* Parasiten, nicht vollständig in der Leberphase attenuiert waren. Bei Experimenten mit den doppelt attenuierten Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten wurde hingegen erfreulicherweise weder *in vitro* noch *in vivo* die Bildung von Merosomen bzw. eine Blutinfektion beobachtet. C57BL/6 Mäuse, die mit Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten immunisiert wurden, waren 30 Tage nach der letzten Immunisierung komplett gegen eine Infektion mit Wildtypsporozoiten geschützt. Es konnte somit eindrucksvoll demonstriert werden, dass sich durch die stadienspezifische Expression eines Toxins in Kombination mit der Deletion eines essentiellen Gens sichere genetisch attenuierte Parasiten herstellen lassen. Dieses im Nagetiermodell neu etablierte System könnte zukünftig für die Attenuierung humanpathogener *Plasmodium-*Spezies getestet werden und dabei helfen, neue Erkenntnisse für die Entwicklung einer effektiven Malariavakzine zu gewinnen.

Abstract

Thus far, no commercially available vaccine exists to combat malaria. Scientific studies show that immunization with genetically attenuated parasites, whose development arrests in the late liver stage, confer sterile cross-stage and cross-species protection against infection with fully virulent *Plasmodium* parasites. The production of safe genetically attenuated parasites requires at least double attenuation of the parasites. So far, this has been achieved through the removal of genes that are essential for liver stage development. However, the selection of eligible genes for this is limited, due to the hitherto relatively little explored liver stage of *Plasmodium* parasites.

In this thesis a new approach for producing double genetically attenuated parasites has been pursued. Initially, using a stage-specific promoter region, a single attenuated *Plasmodium berghei* parasite line was produced, expressing the bacterial pore-forming protein perfringolysin O (PFO) as a V5-fusion protein (PbPFO_{LS}) in the late liver stage. The PFO::V5-expression resulted in premature lysis of the parasitophorous vacuolar membrane and the parasite plasma membrane in late schizonts. Consequently, there was a fast release of proteins from the parasite into the host cell cytosol, which ultimately resulted in the death of the parasite. By immunofluorescence analysis it could be shown that the parasites at this time already expressed proteins of the late liver stage, which was studied exemplarily using SERA2 proteins. Interestingly and unexpectedly, the premature lysis of the parasitophorous vacuolar membrane did not lead to death of the host cell.

Initial immunization experiments with PbPFO_{LS}-parasites in BALB/c and C57BL/6 mice showed that the immunized mice were sterilely protected against infection with fully virulent sporozoites. However, in some cases a blood infection occurred after immunization with PbPFO_{LS}-parasites.

To achieve complete attenuation, double attenuated parasites were produced. For this purpose, one parasite line was generated that combined the PFO::V5-expression with the deletion of the pyruvate dehydrogenase E1 α gene (pdh-e1 α), which is essential for the late phase of liver development (Pbpdhko-PFO_{LS}). The phenotype of the single pdh-e1 α gene deletion in P. berghei has been studied in a parasite line manufactured previously for this purpose. This characterization revealed that the P. berghei pdh-e1 α knockout parasites, in contrast to previously published P. yoelii pdh-e1 α knockout parasites, were not completely attenuated in the liver stage. However, in experiments with double attenuated Pbpdhko-PFO_{LS}-parasites the formation of merosomes and respectively a blood infection was observed neither *in vitro* nor *in vivo*. C57BL/6 mice,

immunized with Pbpdhko-PFO_{LS}-parasites, were completely protected against infection with wild-type sporozoites 30 days after the last immunization. It thus could be demonstrated impressively that the stage-specific expression of a toxin in combination with the deletion of an essential gene allows the production of safe genetically attenuated parasites. This novel established approach used in the rodent system could be tested in the future for attenuating parasites of the human *Plasmodium* species, and help to develop an effective malaria vaccine.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	6
Inhaltsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung	
1.1 Malaria	
1.1.1 Diagnose	
1.1.2 Bekämpfung der Malaria – Prophylaxe, Vektorkontrolle und Behandlung	
1.1.3 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	
1.1.3.1 Mückenstadium	
1.1.3.3 Blutphase	
1.1.4 Malaria-Forschung am Nagetiermodel	
1.2 Immunität gegen Malaria	
1.2.1 Malariavakzine	
1.2.1.1 RTS,S - Vakzine	
1.2.1.2 Lebendimpfstoffe	
1.3 Porenformende Proteine	
1.3.1 MACPF-Proteine	
1.3.2 Cholesterol-dependent cytolysins - CDCs	48
1.4 Zielsetzung	
· ·	
2 Material und Methoden	52
2.1 Material	52
2.1.1 Geräte	52
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	54
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	56
2.1.4 Enzyme	59
2.1.5 Kits	59
2.1.6 Häufig verwendete Lösungen/Medien	60
2.1.7 Oligonukleotide	61
2.1.8 Primärantikörper	62
2.1.9 Sekundärantikörper	63

2	.1.10	Programme und Datenbanken	63
2.2	M	olekularbiologische Methoden	64
2	.2.1	Isolierung von DNA aus Clostrium perfringens Bakterien	64
2	.2.2	Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus erythrozytären P. berghei Stadien	64
2	.2.3	Isolierung der Gesamt-RNA aus P. berghei Leberstadien	64
2	.2.4	Herstellung von cDNA durch reverse Transkription	65
2	.2.5	Photometrische Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen	65
2	.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	66
2	.2.7	Herstellung von V5-dsDNA-Oligonukleotiden	68
2	.2.8	Restriktion von DNA	68
2	.2.9	Agarosegelelektrophorese	70
2	.2.10	Aufreinigung von DNA	70
2	.2.11	DNA-Ligation	70
2	.2.12	Transformation von DNA in E. coli	71
2	.2.13	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Minipräparation)	72
2	.2.14	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem NucleoBond [®] PC 100 Kit	
		(Midipräparation)	73
2	.2.15	DNA-Sequenzierung	73
2	.2.16	Verwendete und klonierte P. berghei Expressionskonstrukte	73
	2.2.1	6.1 pOB90-37-36-Vektor	73
	2.2.1	6.2 pL0017.1.4-Vektor	74
	2.2.1		
	2.2.1		
	2.2.1	5 5 1 1 = 25	
2.3	Κι	ultivierung von <i>P. berghei</i>	77
2	.3.1	Blutstadium	
		.1 Infektion von Mäusen aus Blutstabilaten	
	2.3.1		
	2.3.1	<u> </u>	
2	.3.2	Mückenstadium	
	2.3.2		
	2.3.2		
2.4	_	vitro Infektionsmodell der Leberphase von <i>P. berghei</i>	
2	.4.1	Kultivierung von HepG2-Zellen	
	.4.2	Präparation von <i>P. berghei</i> Sporozoiten	
	.4.3	Infektion von HepG2-Zellen	
- 2.5		erstellung transgener <i>P. berghei</i> Parasiten	
	.5.1	Schizonten-Übernachtkultur	
	.5.2	Isolierung der Schizonten mittels Dichtegradientenzentrifugation	
	.5.3	Elektrotransfektion von <i>P. berahei</i> Schizonten	

	2.5.4	Selektion transgener Parasiten	. 83
	2.5.5	Subklonierung transgener Parasiten durch limiting dilution	. 84
	2.6 H	Herstellung attenuierter <i>P. berghei</i> Sporozoiten durch γ -Bestrahlung (RAS)	. 84
	2.7 F	Fluoreszenzmikroskopische Analysen	. 85
	2.7.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von infizierten HepG2-Zellen	. 85
	2.7.1	1.1 Fixierung	85
	2.7.1	1.2 Färbung	85
	2.7.2	Lebendmikroskopie	. 86
	2.7.2	2.1 Messung der Parasitengröße – density slicing	86
	2.7.2	2.2 Zählen abgelöster Zellen	86
	2.7.2	2.3 Konfokale Videomikroskopie – Aufnahme von Zeitfolgen	87
3	Ergeb	onisse	88
	3.1 A	Attenuierung von <i>P. berghei</i> Parasiten durch leberphasen-spezifische Expression	
	V	on Perfringolysin O	. 88
	3.2 A	Attenuierung von P . berghei Leberstadien durch Deletion des pdh - $e1lpha$ Gens	103
	3.3 H	Herstellung und Charakterisierung doppelt attenuierter P. berghei Parasiten	111
4	Disku	ıssion	119
5	Litera	aturverzeichnis	140
D	anksagun	ngen	154

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Verbreitung der Malaria	16
Abb. 1.2:	Verbreitung der Anopheles Mücke	18
Abb. 1.3:	Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	23
Abb. 1.4:	Interaktionen von Sporozoiten in der Haut	25
Abb. 1.5:	Die Leberphase von <i>Plasmodium</i>	30
Abb. 1.6:	Verschiedene Angriffspunkte für Malariavakzine	38
Abb. 1.7:	Schlüsselenzyme des Fettsäuremethabolismus im Apikoplasten (Schema)	45
Abb. 1.8:	Schematische Darstellung der Porenbildung von Listeriolysin (LLO)	49
Abb. 2.1:	Schematische Darstellung des pOB90-37-36-Vektors	73
Abb. 2.2:	Schematische Darstellung der Klonierung des pL0017.1.4-Vektors	74
Abb. 3.1:	Herstellung einer PFO-exprimierenden Parasitenlinie - PbPFO _{LS}	89
Abb. 3.2:	PbPFO _{LS} -Parasiten exprimieren PFO::V5-Fusionsproteine	91
Abb. 3.3:	PbPFO _{LS} -Parasiten zeigen einen veränderten Phänotyp in der späten	
	Leberphase	92
Abb. 3.4:	GFP aus den PbPFO _{LS} -Parasiten gelangt kurz nach Beginn der PFO::V5	
	Expression in die Wirtszelle	94
Abb. 3.5:	PbICP ist nach der PVM/PPM-Perforation im Wirtszellzytosol	
	PbPFO _{LS} -infizierter Zellen nachweisbar	95
Abb. 3.6:	PbPFO _{LS} -Parasiten exprimieren SERA2 – ein Protein der späten	
	Leberphase	97
Abb. 3.7:	Quantifizierung intakter P. berghei Parasiten zu verschiedenen	
	Zeitpunkten nach Infektion	98
Abb. 3.8:	PbPFO _{LS} -Parasiten attenuieren in der Leberphase	100
Abb. 3.9:	Challenge von immunisierten Balb/c- bzw. C57BL/6-Mäusen	102
Abb. 3.10:	Alignment der P. berghei und P. yoelii PDH-E1α-Aminosäure-Sequenzen	104
Abb. 3.11:	Herstellung der Pbpdhe1α Knockout Parasiten	105
Abb. 3.12:	Pbpdhe1α-Parasiten exprimieren Mspl	107
Abb. 3.13:	Quantifizierung intakter P. berghei Parasiten und Messung der	
	Parasitengröße zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion	109
Abb. 3.14:	Einige Pbpdhe1α-Parasiten können die Leberphase beenden	110
Abb. 3.15:	Herstellung von Pbpdhko-PFO _{LS} -Parasiten	112
Abb. 3.16:	Pbpdhko-PFO _{LS} -Parasiten zeigen eine vergleichbare Entwicklung zu den	
	PbPFO _{LS} -Parasiten	114
Abb. 3.17:	Quantifizierung von Pbpdhko-PFO _{LS} -Leberstadien	116
Abb. 3.18:	Challenge von immunisierten C57BL/6 Mäusen	118
Abb. 4.1:	Zusammenfassendes Modell zur PFO-induzierten Parasitendegradation	139

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Geräte	52
Tab. 2.2:	Verbrauchsmaterialien	54
Tab. 2.3:	Chemikalien und Reagenzien	56
Tab. 2.4:	Enzyme	59
Tab. 2.5:	Kits	59
Tab. 2.6:	Häufig verwendete Lösungen/Medien	60
Tab. 2.7:	Oligonukleotide	61
Tab. 2.8:	Primärantikörper	62
Tab. 2.9:	Sekundärantikörper	63
Tab. 2.10:	Programme und Datenbanken	63
Tab. 2.11:	Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese	65
Tab. 2.12:	Temperaturprogramm für cDNA-Synthese	65
Tab. 2.13:	PCR-Reaktionsansatz für GoTaq® DNA-Polymerase	66
Tab. 2.14:	PCR-Reaktionsansatz für Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase	67
Tab. 2.15:	PCR-Reaktionsansatz für die GoTaq® und die Phusion™ High	
	Fidelity DNA-Polymerase	67
Tab. 2.16:	Temperaturprogramm für das Oligonukleotid-annealing	68
Tab. 2.17:	Zusammensetzung von Restriktionsansätzen	69
Tab. 2.18:	Reaktionsansatz für CIP-Behandlung	69
Tab. 2.19:	Reaktionsansatz für eine Ligation	71
Tab. 3.1:	Infektion von Balb/c- bzw. C57BL/6-Mäusen mit PbPFO _{LS} -Sporozoiten	101
Tab. 3.2:	Infektion von C57BL/6-Mäusen mit Pbpdhko-PFO _{LS} -Sporozoiten	117

Abkürzungsverzeichnis

% Prozent
Abb. Abbildung

A. dest destilliertes Wasser

AMA1 Apical Membrane Antigen 1

Amp Ampicillin

A. stephensi Anopheles stephensi
ATP Adenosintriphosphat

BSA bovine serum albumin, Rinderserumalbumin

bp Basenpaare

bzw. beziehungsweise

ca. Circa

CDC Centers for Disease Control and Prevention

cDNA komplementäre DNA

C-terminal am Carboxyende

CSP circumsporozoite protein

CO₂ Kohlenstoffdioxid

DAPI 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol dATP Desoxyadenosintriphosphat

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

DNase Desoxyribonuklease

dNTP Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat

DTT Dithiothreitol

E. coli Escherichia coli

E-64 L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)-butane

EDTA Ethylendiamintetraacetat

ef1 α Elongationsfaktor 1 α

ER Endoplasmatisches Reticulum

et al. et alteri (und andere)

Expl exported protein I

FAS-II fatty acid synthesis II, Fettsäuresyntheseweg II

FCS fötales Kälberserum

g Gramm

GAP genetisch attenuierte (abgeschwächte) Parasiten

gDNA genomische DNA

GFP grün fluoreszierendes Protein

GPI-Anker Glykosylphosphatidylinositol-Anker

GST Glutathion-S-Transferase

h Stunde(n)

hpi hours post infection, Stunden nach Infektion

HEPES N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HepG2 Humane Hepatomazelllinie HSPGs Heparansulfat-Proteoglykan

i.p. intraperitoneal
 i.v. intravenös
 k Kilo (10³)
 l Liter

LB Luria-Bertani
LLO Listeriolysin
LS Leberstadium

M molar (mol/l), Megam milli (10⁻³), Meter

MHC Major Histocompatibility Complex

(Haupthistokompatibilitätskomplex)

μ Mikro (10⁻⁶) Min Minute

mRNA messenger RNA

n nano (10⁻⁹)

N-terminal am Aminoende

nt Nukleotide

OD Optische Dichte

P. Plasmodium

Pb Plasmodium berghei

PbICP P. berghei inhibitor of cystein proteases

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PDH-E1 α Pyruvatdehydrogenase E1 α -Untereinheit

pH negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

PFO Perfringolysin O

PV parasitophore Vakuole

Abkürzungsverzeichnis

PVM parasitophore Vakuolenmembran

Py Plasmodium yoelii

RAS radiation attenuated sporozoites, bestrahlte Sporozoiten

RNA Ribonukleinsäure

RNase Ribonuklease

rRNA ribosomale Ribonukleinsäure RT-PCR reverse Transkriptase PCR

s Sekunden

SDS Natriumdodecylsulfat
SERA Serine repeat antigen

SPECT Sporozoite microneme protein essential for cell transversal

Tab. Tabelle

TAE Tris-Acetat-EDTA

T. gondii Toxoplasma gondii

TRAP Thrombospondin-related adhesive protein

Tris Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan

U Unit (Einheit der biologischen Aktivität)

uis upregulated in sporozoites

UTR *untranslated region*, nicht translatierte Region

UV Ultraviolett

V Volt

V5 V5-Epitop

Vol. Volumenanteile

v/v Volumen pro Volumen

WHO World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

z.B. zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Malaria

Malaria ist eine der bedeutendsten Tropenkrankheiten. Schätzungen zufolge lebt etwa die Hälfte der Weltbevölkerung in Malaria-Endemiegebieten (WHO, 2010b). Bis in die 60er Jahre hinein war die Malaria auch in weiten Teilen Europas verbreitet (Greenwood et al., 2008). Heutzutage erstreckt sich die Verbreitung der Malaria jedoch vorwiegend auf die Tropen und Subtropen. Betroffen sind dabei vor allem Zentral- und Südafrika, Asien, Lateinamerika sowie Teile des Mittleren Ostens (Abb. 1.1) (WHO, 2010b).

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erkranken jährlich mehr als 300 Millionen Menschen an Malaria. Für fast eine Million Menschen verläuft diese Krankheit tödlich. Nahezu 90 % der Todesfälle ereignen sich allein in Afrika wobei überwiegend Kinder unter 5 Jahren und schwangere Frauen betroffen sind. Statistisch betrachtet stirbt jedes fünfte afrikanische Kind an Malaria (WHO, 2010b).

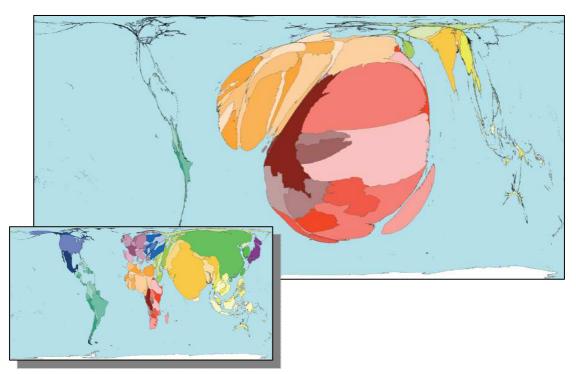


Abb. 1.1: Verbreitung der Malaria

Verzerrte Größendarstellung der Länder entsprechend der jeweiligen Anzahl an Malaria erkrankter Personen (großes Bild). Zum Vergleich sind die Ländergrößen entsprechend ihrer jeweiligen Bevölkerungsanzahl angegeben (kleines Bild).

© Copyright SASI Group (University of Sheffield) and Mark Newman (University of Michigan); Stand 2004, (Quelle: http://www.worldmapper.org/display.php?selected=2 und http://www.worldmapper.org/display.php?selected=229)

Neben der großen Gesundheitsproblematik sind mit der Malaria in vielen Endemiegebieten auch schwerwiegende wirtschaftliche Probleme verbunden. Die ärmsten Länder sind am schwersten von den Auswirkungen betroffen. Zum einen müssen jährlich enorme Kosten für die medizinische Betreuung und Versorgung der Erkrankten aufgebracht werden. Zum anderen verlieren die Länder unter anderem durch das krankheitsbedingte Ausfallen von Arbeitskräften an Produktivität. Laut Schätzungen der WHO führt Malaria in einigen afrikanischen Ländern zu jährlichen Wachstumseinbußen von bis zu 1,3 %. Somit fehlen Gelder, die zur Verbesserung der Infrastruktur und des Gesundheitssystems dringend benötigt würden (WHO, 2010a).

Der Name Malaria entstammt der italienischen Bezeichnung "Mala aria", was soviel bedeutet wie "schlechte Luft", da man zu früheren Zeiten, als die Ursachen der Krankheit und der Übertragung noch nicht bekannt waren, Sumpf- und Marschlandschaften mit der Malaria in Verbindung brachte. Die Symptome der Krankheit wurden bereits vor über 4.000 Jahren beschrieben. Jedoch gelang es erst dem französischen Forscher Charles Laveran im Jahr 1880 die Erreger der Malaria im Blut von Malariapatienten nachzuweisen. Es handelt sich dabei um eukaryotische, einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodium* (Phylum *Apikomplexa*). Knapp 17 Jahre nach Laverans Entdeckung konnte der Brite Ronald Ross zeigen, dass die Malariaparasiten durch Mücken der Gattung *Anopheles* übertragen werden (CDC, 2011a). Insgesamt sind 430 verschiedene *Anopheles*-Spezies bekannt. Davon sind 30 bis 40 Spezies potentiell in der Lage die humanpathogenen Malariaparasiten zu übertragen (CDC, 2011a) (Abb. 1.2). Als Überträger, häufig auch als Vektoren bezeichnet, fungieren ausschließlich weibliche Mücken, da diese Blut für die Produktion neuer Mückeneier aufnehmen müssen.

Bisher wurden weit über 200 verschiedene *Plasmodium*-Spezies beschrieben. Diese weisen unterschiedliche Wirtsspezifitäten auf. Hauptsächlich werden Reptilien aber auch Vögel und Nagetiere infiziert (CDC, 2011a). Lange Zeit waren nur 4 humanpathoge *Plasmodium*-Spezies bekannt (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. falciparum*). Neuere Studien haben jedoch ergeben, dass *P. knowlesi* Parasiten, die normalerweise Affen infizieren, auch in Menschen eine Malaria hervorrufen können (Cox-Singh and Singh, 2008). Abhängig von der *Plasmodium*-Spezies, mit welcher ein Patient infiziert ist, variiert das Krankheitsbild der Malaria (Cox-Singh and Singh, 2008; Garcia, 2010).

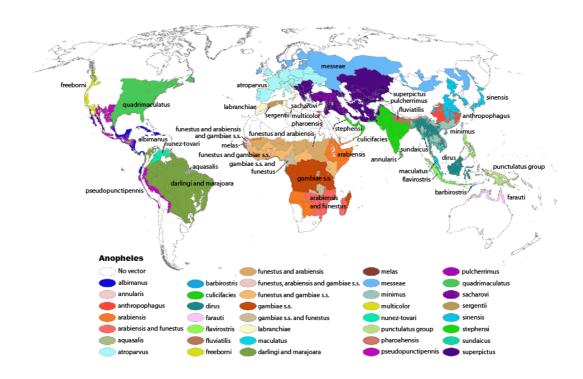


Abb. 1.2: Verbreitung der Anopheles Mücke

Quelle: (Kiszewski et al., 2004)

Nachdem die Parasiten durch den Stich einer infizierten Anopheles Mücke in den Menschen gelangt sind, infizieren sie zunächst die Leber. Hier vermehren sie sich und gelangen nach einer Inkubationszeit von etwa 8 bis 17 Tagen (bei P. malariae 18 bis 40 Tage) ins Blut. Bis zu diesem Zeitpunkt verläuft eine Plasmodium-Infektion vollkommen asymptomatisch. Im Blut infizieren die Parasiten rote Blutzellen, vermehren sich in ihnen und werden schließlich durch Zelllyse wieder freigesetzt und infizieren umgehend neue rote Blutzellen. Mit Ausnahme von P. falciparum verläuft die Freitsetzung der Parasiten nach wenigen Zyklen synchron, so dass schlagartig eine große Anzahl infizierter Erythrozyten zerstört und Parasiten ins Blut entlassen werden (Garcia, 2010). Dies bewirkt durch die Freisetzung inflammatorischer Zytokine eine stark ausgeprägte Immunantwort, wodurch es zu schweren Fieberschüben kommt, die für eine Malaria charakteristisch sind (Hafalla et al., 2011). Bei einer Infektion mit P. vivax oder P. ovale erfolgen diese Fieberschübe alle 48 h (Malaria tertiana), bei einer Infektion mit P. malariae alle 72 h (Malaria quartana). Neben den charakteristischen Fieberschüben treten grippeähnliche Symptome wie Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Schweißausbrüche sowie ein allgemeines Unwohlsein auf (Garcia, 2010).

Eine Infektion mit P. falciparum führt zur gefährlichsten Malariaform, der Falciparum-Malaria, auch Malaria tropica genannt. Die Fieberschübe treten hier unregelmäßig auf. Im Gegensatz zu den anderen humanpathogenen Plasmodium-Spezies verändert P. falciparum die Zelloberfläche der Erythrozyten durch den Einbau spezifischer Parasitenproteine. Dieses ermöglicht die Anheftung der infizierten Erythrozyten an das Kapillarendothel der Blutgefäße (Sequestrierung). Durch diesen Mechanismus entgehen die Parasiten einer potentiellen Entfernung aus dem Blut durch die Milz (Miller et al., 1994). Neben der Sequestrierung kommt es weiterhin zu einer Aneinanderhaftung (Rosettenbildung) infizierter und nicht infizierter Erythrozyten. Dieses kann zu Gefäßverstopfungen und daraus resultierenden Organschädigungen führen. Bedingt durch die hohe Parasitämie (Parasitenanzahl im Blut), die bei einer Infektion mit P. falciparum auftreten kann, besteht die Gefahr einer hämolytischen Anämie (Garcia, 2010). Neben diesen und weiteren Komplikationen können vor allem schwere neurologische Komplikationen auftreten, die unter der Bezeichnung zerebrale Malaria zusammengefasst werden. Die Symptome der zerebralen Malaria umfassen Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma. Eine unbehandelte zerebrale Malaria endet in den meisten Fällen tödlich (Garcia, 2010; Turner, 1997).

P. vivax und P. ovale sind in der Lage, Ruhestadien in der Leber (Hypnozoiten) zu bilden. Trotz einer erfolgreichen therapeutischen Entfernung der Parasiten aus dem Blut kann es somit nach einigen Wochen bis Monaten (bis hin zu einigen Jahren) zu einem Rückfall (Rezidiv) kommen. Aus diesem Grund ist eine genaue Diagnose der Malaria und eine adäquate Behandlung unerlässlich (Garcia, 2010).

1.1.1 Diagnose

Eine frühzeitige Diagnose einer Malaria, insbesondere bei einer Infektion mit *P. falciparum* ist sehr wichtig, um die Patienten adäquat und erfolgreich behandeln zu können. Eine Diagnose-Möglichkeit ist der mikroskopische Nachweis der Parasiten im Blutausstrich. Bei der Methode des "dünnen Tropfens", bei der nur ein kleiner Blutstropfen ausgestrichen und analysiert wird, kann anhand der Morphologie die jeweilige Parasitenspezies bestimmt werden. Die Methode des "dicken Tropfens" ermöglicht hingegen den Nachweis von Parasiten bei einer geringeren Parasitämie. Diese Methoden sind schnell, sensitiv und kostengünstig. Allerdings setzen sie gut geschultes Personal voraus und versagen bei einer sehr geringen Parasitämie (CDC, 2011a; Garcia, 2010).

Weiterhin wurden für die Diagnose einer *Plasmodium* Infektion verschiedene kommerziell erhältliche Schnelltests entwickelt. Der Nachweis beruht dabei z.B. auf der antikörperbasierten Detektion der parasitenspezifischen Laktat-Dehydrogenase oder dem HRP2 (*histidine-rich protein 2*). Für den Parasitennachweis bei einer sehr geringen Parasitämie reagieren einige dieser Tests jedoch nicht sensitiv genug. Auch kann es bei einer Mehrfachinfektion mit verschiedenen *Plasmodium*-Spezies zu falschen bzw. nicht eindeutigen Ergebnissen kommen. Eine anschließende mikroskopische Analyse ist daher oft unerlässlich. Erschwerend kommt hinzu, dass einzelne Tests gekühlt gelagert werden müssen, was in den Malariaendemiegebieten und auf Reisen nicht immer gegeben ist (CDC, 2011a; Garcia, 2010).

Eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Parasiten im Blut ist die PCR. Hiermit kann bereits eine Anzahl von 5 bis 10 Parasiten pro µl Blut nachgewiesen werden. Darüber hinaus ermöglicht die PCR-Analyse auch die Unterscheidung verschiedener *Plasmodium*-Spezies, selbst bei einer Mischinfektion. Allerdings erfordert auch diese Methode gut geschultes Personal sowie ein hierfür spezialisiertes Labor und ist somit verhältnismäßig teuer (CDC, 2011a; Garcia, 2010).

1.1.2 Bekämpfung der Malaria – Prophylaxe, Vektorkontrolle und Behandlung

Es existieren verschiedene vorbeugende Maßnahmen, um eine Plasmodieninfektion zu verhindern und die Verbreitung der Malaria einzuschränken. Reisenden wird unter bestimmten Voraussetzungen (abhängig von Reiseziel, Jahreszeit und persönlicher Gesundheitssituation) eine Chemoprophylaxe bzw. die Mitnahme von Medikamenten zur notfallmäßigen Eigentherapie (*Stand-by* Therapie) empfohlen (CDC, 2011b). Da diese Medikamente jedoch häufig starke Nebenwirkungen hervorrufen ist ihre Anwendung nicht unproblematisch. Es lässt sich jedoch auch schon durch das Befolgen verhältnismäßig einfacher Verhaltensregeln ohne Medikamente das Risiko einer Plasmodieninfektion stark reduzieren. So sollten generell in Malariaendemiegebieten bei einem Aufenthalt außerhalb geschlossener, mückensicherer Räume Insektenschutzmittel (*repellents*) aufgetragen und möglichst helle, lange Kleidung getragen werden. Dies gilt vor allem für die Dämmerungs- und Nachtstunden, da hier die *Anopheles* Mücken aktiv sind. Im Rahmen der Expositionsprophylaxe und Vektorkontrolle empfiehlt die WHO die Verwendung insektizidbehandelter Bettnetze

(LLINs: <u>long lasting insecticide-treated mosquito nets</u>) und sowie die Verwendung von insektiziden Raumsprays (IRS: <u>indoor residual spraying</u>).

Eines der wichtigsten Insektizide welches immer noch bei der Vektorkontrolle zum Einsatz kommt ist DDT (<u>D</u>ichloro<u>d</u>iphenyl<u>t</u>richlorethan). Dieses Insektizid führte bereits während des globalen Malaria Ausrottungsprogramms (GMEP: <u>G</u>lobal <u>M</u>alaria <u>E</u>radication <u>P</u>rogram 1955 - 1969) zu großen Erfolgen bei der Bekämpfung der Malaria (Najera et al., 2011) und wird seit einigen Jahren von der WHO wieder für das IRS empfohlen (WHO, 2010b). Der Einsatz von DDT ist jedoch aufgrund potentieller gesundheitsschädigender Wirkungen nicht unumstritten und im Laufe der Zeit haben sich DDT-Resistenzen bei einigen Malaria-Vektoren entwickelt (WHO, 2010b). Die Suche nach neuen Insektiziden ist somit von großer Bedeutung.

Neben chemischen Insektiziden wird auch die Entwicklung biologischer Insektizide angestrebt. Für die bakteriellen Spezies *Bacillus thuringensis israelensis* und *Bacillus sphaericus* konnte bereits erfolgreich eine toxische Wirkung im Mitteldarm von Mückenlarven gezeigt werden (Raghavendra et al., 2011). Weiterhin werden auch insektizide Viren und pathogene Pilze wie z.B. *Metarhizium anisopliae* hinsichtlich einer toxischen Wirkung gegen *Anopheles* Larven bzw. gegen die Plasmodiumparasiten in der Mücke untersucht. Die Vorteile biologischer Insektizide sind neben geringeren Produktionskosten und einem engeren Wirkungsspektrum eine hohe Effizienz bei relativ geringen Dosen (Fang et al., 2011; Raghavendra et al., 2011).

Ein altruistischer Ansatz bei der Bekämpfung der Malaria ist die Entwicklung von Impfstoffen, die die Übertragung der Parasiten vom Menschen in die Mücke bzw. die anschließende Parasitenvermehrung in der Mücke blockieren (*transmission-blocking vaccines*). Dadurch wird zwar der Patient an sich nicht geschützt, aber die Verbreitung der Malaria kann somit eingedämmt werden. Versuche mit ersten Impfstoffen dieser Art lieferten im Malaria-Nagetiermodel bereits gute Ergebnisse (Matuschewski and Mueller, 2007).

Im Falle einer Plasmodieninfektion müssen die Malariaerreger diagnostisch identifiziert werden. Weiterhin ist es wichtig zu ermitteln, in welcher Region der Patient mit den Malariaerregern infiziert wurde, da die Parasiten in einigen Gebieten bereits Resistenzen gegen bestimmte Malariamedikamente entwickelt haben. Daran anschließend sollte umgehend eine angepasste Chemotherapie eingeleitet werden, um einen möglicherweise schweren Verlauf der Malaria zu unterbinden. Die WHO empfiehlt hierzu Kombinationstherapien mit mehreren Malariamedikamenten, um dadurch das Wirkungsspektrum zu vergrößern und um möglichen Resistenzen der Parasiten auszuweichen. Die aktuelle Empfehlung beläuft sich auf eine Artemisinin-

basierte Kombinationstherapie (<u>Artemisinin-based combination therapy</u>, ACT) (WHO, 2010b). Zur Entfernung von *P. vivax* oder *P. ovale* Hypnozoiten in der Leber, muss gegebenenfalls zusätzlich eine Behandlung mit dem Medikament Primaquin erfolgen (CDC, 2011b).

Den vermutlich wirksamsten Schutz vor einer Plasmodieninfektion und den damit verbundenen Krankheitssymptomen sowie die beste Grundlage zur Ausrottung der Malaria würde jedoch eine Impfung bieten. Aus diesem Grund, und vor dem Hintergrund eines bisher fehlenden kommerziell erhältlichen Impfstoffes, kommt der Malariavakzineentwicklung eine hohe Priorität zu.

1.1.3 Der Lebenszyklus von Plasmodium

Die Plasmodiumparasiten durchlaufen während ihres komplexen Lebenszyklus einen Wirts- sowie einen Generationswechsel. Im Vertebratenwirt erfolgt die obligat intrazelluläre, asexuelle Vermehrung der Parasiten in den Zellen der Leber (exoerythrozytäre Stadien) und den roten Blutzellen (erythrozytäre Stadien oder auch Blutstadien) (Abb. 1.3). Die sexuelle Vermehrung findet in der *Anopheles* Mücke statt. Dementsprechend gilt die *Anopheles* Mücke als Hauptwirt, der Vertebratenwirt ist der Zwischenwirt. Die einzelnen Entwicklungsstadien werden im Folgenden erklärt.

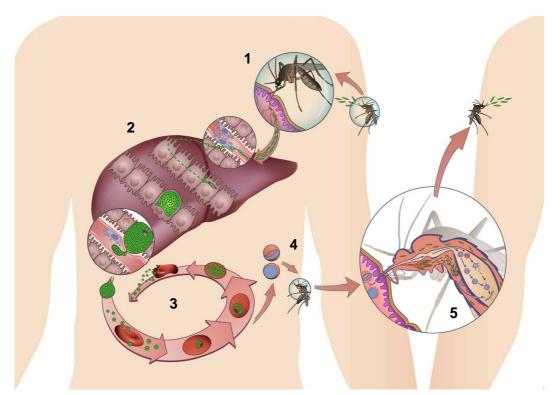


Abb. 1.3: Der Lebenszyklus von Plasmodium

1) Beim Stich einer infizierten Anopheles Mücke werden Sporozoiten in die Haut des Vertebratenwirts übertragen. 2) Über den Blutstrom gelangen die Sporozoiten in die Leber. In den Sinusoiden der Leber adhärieren die Sporozoiten und gelangen durch Transmigration von Kupfferzellen in das Lebergewebe. Nach Transmigration einiger Hepatozyten infizieren sie einen Hepatozyten unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (PV). Es folgt eine enorme Replikation der Parasiten bis hin zur Bildung tausender Merozoiten. Die Merozoiten gelangen nach Auflösung der PV-Membran ins Wirtszellzytosol und werden in Form von Merosomen in die Lebersinusoide abgeschnürt. 3) Durch die Ruptur der Merosomen werden die Merozoiten freigesetzt. Diese infizieren sofort rote Blutzellen, in denen es dann zur weiteren Vermehrung der Parasiten kommt. Durch Zelllyse werden die neuen Merozoiten freigesetzt, welche umgehend neue rote Blutzellen infizieren. 4) Neben der zyklischen Vermehrung kommt es auch zur Entwicklung der geschlechtlichen Parasitenformen (Gametozyten). Werden diese bei der Blutmahlzeit einer Anopheles Mücke aufgenommen, kommt es zur geschlechtlichen Vermehrung der Parasiten. 5) Im Mückendarm verschmilzt ein männlicher mit einem weiblichen Gametozyten zu einem motilen Ookineten (Zygote), welcher das Mitteldarmepithel transmigriert und sich anschließend zur Oocyste entwickelt. Aus dieser gehen tausende Sporozoiten hervor, die die Speicheldrüse der Mücke invadieren und bei der nächsten Blutmahlzeit zusammen mit dem Speichelsekret in einen neuen Vertebratenwirt gelangen. Quelle: Sturm und Heussler, 2007

1.1.3.1 Mückenstadium

Bei einer Blutmahlzeit einer weiblichen Anopheles Mücke an einem mit Plasmodium infizierten Vertebratenwirt gelangen die Parasiten in die Mücke. Im Mückenmitteldarm entwickeln sich die weiblichen Macrogametozyten zu Makrogameten. Aus einem männlichen Mikrogametozyten gehen hingegen jeweils acht bewegliche Mikrogameten hervor. Diese werden in einem als "Exflagellation" bezeichneten Prozess aus der roten

Blutzelle freigesetzt und begeben sich anschließend auf die Suche nach einem Makrogameten. Bei der anschließenden Verschmelzung eines Mikrogameten mit einem Makrogameten entsteht die Zygote, die sich wiederum in einen beweglichen Ookineten differenziert. Der Ookinet transmigriert die peritrophe Matrix und das Mitteldarmepithel. Zwischen dem Mitteldarmepithel und der Basallamina wandelt sich der Ookinet schließlich zur Oozyste um, in welcher innerhalb von 10-14 Tagen durch asexuelle Vermehrung tausende Sporozoiten entstehen. Dieser Prozess wird als Sporogonie bezeichnet. Die Oozyste platzt auf und entlässt die Sporozoiten in die Hämolymphe. Mit der Zirkulation der Hämolymphe gelangen die Sporozoiten zu den Speicheldrüsen der Mücke. Über bisher noch nicht vollständig aufgeklärte, spezifische Prozesse erkennen und invadieren die Sporozoiten schließlich die Speicheldrüsen. Von hier aus gelangen sie bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke in einen neuen Vertebratenwirt (Ghosh et al., 2000; Ghosh and Jacobs-Lorena, 2009).

1.1.3.2 Die Exoerythrozytäre Phase

Der Weg von der Haut zur Leber

Bei der Blutmahlzeit einer infizierten Anopheles Mücke gelangen die Sporozoiten in den Vertebratenwirt. Die Anzahl der inokulierten Sporozoiten ist dabei im Vergleich zur Sporozoitenzahl in den Speicheldrüsen der Mücke erstaunlich klein und liegt durchschnittlich bei 100 Sporozoiten. Unter anderem mit Hilfe der Intravitalmikroskopie konnte aufgeklärt werden, dass die Sporozoiten in das avaskuläre Gewebe der Haut injiziert werden und nicht, wie ursprünglich angenommen, direkt in die Blutbahn (Abb. 1.4) (Amino et al., 2007; Amino et al., 2006; Medica and Sinnis, 2005; Sidjanski and Vanderberg, 1997; Vanderberg and Frevert, 2004; Yamauchi et al., 2007). Kurz nach ihrer Inokulation beginnen die Sporozoiten mit einer spiralförmigen Vorwärtsbewegung (Amino et al., 2006; Vanderberg and Frevert, 2004). Dabei handelt es sich um eine gleitende Fortbewegung (gliding motility), die durch Zusammenspiel Aktin-Myosin-basierten Motormaschinerie einer und der kontinuierlichen Sezernierung von Adhäsionsproteinen durch den Parasiten ermöglicht wird (Kappe et al., 1999; Matuschewski and Schuler, 2008). Zwei der prominentesten Adhäsionsproteine sind TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) und CSP (circumsporozoite protein). Bei der Vorwärtsbewegung der Sporozoiten werden diese

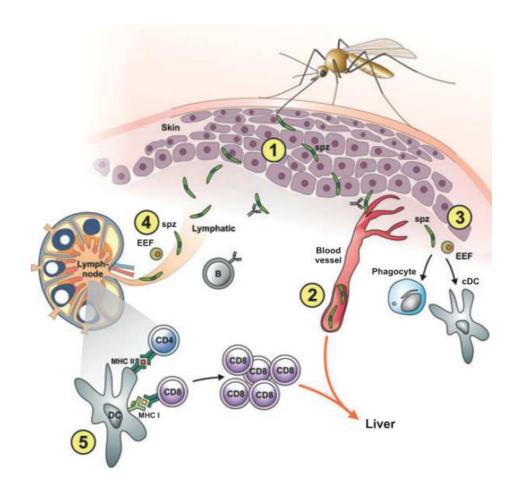


Abb. 1.4: Interaktionen von Sporozoiten in der Haut

1) Sporozoiten (spz) werden beim Stich einer infizierten Anopheles Mücke in das avaskuläre Gewebe der Haut injiziert. 2) Die Sporozoiten transmigrieren Hautzellen und gelangen schließlich über eine Kapillare in den Blutstrom. 3) Einige Sporozoiten werden durch phagozytierende Zellen eliminiert. Einigen gelingt zuvor noch die unvollständige Entwicklung zu exoerythrozytären Parasitenstadien (EEF). 4) Ein anderer Teil der Sporozoiten wird über das lymphatische System zu einem peripheren Lymphknoten transportiert. 5) Nach ihrer Eliminierung durch dendritische Zellen (DC) dienen sie als Antigen-Quelle zur Aktivierung von T-Zellen.

Quelle: (Hafalla et al., 2011)

Proteine kontinuierlich proteolytisch abgespalten, so dass die Sporozoiten eine charakteristische TRAP- und CSP-Spur hinterlassen. Vor allem CSP wird aufgrund seiner immunodominanten Wirkung als wichtiger Kandidat bei der Entwicklung von Malariaimpfstoffen angesehen (Frevert et al., 1993; Hafalla et al., 2011; Kappe et al., 1999; Stewart and Vanderberg, 1991; Sultan et al., 1997).

Lediglich 50 % der ursprünglich injizierten Sporozoiten verlassen die Einstichstelle und rund 70 % dieser Sporozoiten erreichen eine Blutkapillare, die sie invadieren und auf diesem Weg in den Blutstrom gelangen (Abb. 1.4). Auf ihrem Weg zu den Blutgefäßen müssen die Sporozoiten phagozytierenden Zellen des Immunsystems entgehen, die sich ebenfalls in der Haut befinden. Diese eliminieren im Normalfall einen Großteil

körperfremder Pathogene und verwenden die daraus resultierenden Antigene für die Generierung einer Immunantwort. Um einer Eliminierung zu entgehen, transmigrieren die Sporozoiten die Phagozyten (Amino et al., 2008).

Schätzungsweise 20 % der Sporozoiten gelangen über das Lymphsystem zu einem der peripheren Lymphknoten, wo die Mehrzahl der Sporozoiten von phagozytierenden dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und degradiert wird (Amino et al., 2008; Amino et al., 2006) (Abb. 1.4). Bei DCs handelt es sich um professionelle Antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems. Ein wichtiges Antigen, das von den DCs präsentiert wird, ist das bereits erwähnte CSP. Es wird angenommen, dass ein erster großer Anteil protektiver CD8⁺ T-Zellen bereits in den nahe der Einstichstelle gelegenen peripheren Lymphknoten aktiviert wird (*priming*). Die aktivierten CD8⁺ T-Zellen gelangen anschließend in die Leber, wo sie infizierte Hepatozyten anhand präsentierter Antigene erkennen und eliminieren können (Chakravarty et al., 2007; Overstreet et al., 2008).

Ein großer Teil der injizierten Sporozoiten verbleibt an der Einstichstelle und wird überwiegend von phagozytierenden Zellen entfernt (Abb. 1.4). Es konnte jedoch im Malaria-Nagetiermodel gezeigt werden, dass sich einige der Sporozoiten auch in Epidermis- und Haarfollikelzellen unter Ausbildung einer PV bis hin zu Merozoiten entwickeln, die sogar in der Lage waren, Erythrozyten zu infizieren (Coppi et al., 2011; Gueirard et al., 2010). Haarfollikel stellen immunprivilegierte Bereiche dar, da sie unter anderem nicht die Fähigkeit besitzen, dem Immunsystem Antigene über MHC-Klasse-I Komplexe zu präsentieren (Gueirard et al., 2010). Somit könnten Haarfollikelzellen den Parasiten als alternative Wirtszellen und evt. als Orte zur Ausbildung von länger persistierenden Ruhestadien dienen, die gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt eine neue Blutinfektion etablieren. Bisher sind solche Ruhestadien nur von P. vivax und P. ovale in der Leber bekannt. Parasiten, die sich in der Haut zu exerythrozytären Stadien differenzieren und dabei von Zellen des Immunsystem erkannt werden, würden dem Immunsystem auf diesem Weg ein breiteres Spektrum von Parasitenantigenen liefern, welches nicht nur auf Antigene aus Sporozoiten beschränkt ist (Gueirard et al., 2010).

Die Sporozoiten, die über eine Kapillare ins Blut gelangt sind, erreichen mit dem Blutstrom die Leber. Dort adhärieren sie in den feinen Lebersinusoiden. Es wurde lange Zeit vermutet, dass die Adhäsion der Sporozoiten über die Bindung von CSP an die in der Leber in hoher Konzentration vorkommenden Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) erfolgt (Frevert et al., 2005; Frevert et al., 1993; Menard, 2000; Pinzon-Ortiz et al., 2001; Pradel et al., 2002). Vor dem Hintergrund der Ergebnisse einer vor kurzem

veröffentlichten Studie muss diese Modellvorstellung jedoch neu überdacht und angepasst werden (Coppi et al., 2011), wie weiter unten erläutert wird.

Die Hepatozyten sind für die Sporozoiten nicht direkt erreichbar, sondern sie sind durch eine Lage lebersinusoidaler Epithelzellen (LSECs) vom Lumen der Sinuoside abgeschirmt. In der Epithelschicht befinden sich zudem Kupffer-Zellen, spezialisierte Makrophagen. Die LSECs weisen ungefähr 100 nm große Löcher auf, die sogenannten fenestrae. Durch diese reichen die membrangebundenen HSPGs, die von Hepatozyten und Stellatzellen präsentiert werden, bis in die Sinusoide (Frevert et al., 1993; Pradel et al., 2002). Nach der Anhaftung an das sinusoidale Endothel gleitet ein Sporozoit das Endothel entlang bis er eine Kupffer-Zelle erreicht, die er transmigriert, um zu den Hepatozyten zu gelangen (Baer et al., 2007b; Mota et al., 2001; Pradel and Frevert, 2001).

Die Sporozoiten werden von den Kupffer-Zellen nicht erkannt und entfernt. Vielmehr modulieren die Sporozoiten das Zytokinprofil der Zellen und unterdrücken proinflammatorische Reaktionen, wie z.B. die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (respiratorischer *burst*) und lösen bei einigen Kupffer-Zellen Apoptose aus. Dieses gelingt den Sporozoiten unter anderem durch die Bindung von CSP an LRP-1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) auf der Oberfläche der Kupffer-Zellen. Hierdurch werden Signaltransduktionswege in den Kupffer-Zellen induziert, die zu einer Konzentrationserhöhung der sekundären Botenstoffe cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat) führen (Klotz and Frevert, 2008; Usynin et al., 2007).

Bisher konnten einige *Plasmodium* Proteine entdeckt werden, die für die Transmigration der Parasiten eine essentielle Funktion übernehmen. Dabei handelt es sich um SPECT 1 (<u>sporozoite microneme protein essential for cell traversal</u>), SPECT 2 (auch PLP 1 genannt, <u>perforin-like protein 1</u>), CelTOS (<u>cell traversal protein for ookinetes and sporozoites</u>) sowie eine Phospholipase. SPECT 2 besitzt eine Domäne, die auch in porenformenden Proteinen zu finden ist (<u>membrane attack complex/perforin (MACPF)-like domain</u>). Deletionsmutanten von SPECT 1, SPECT 2 und CelTOS waren nicht mehr in der Lage, die sinusoidale Barriere zu überwinden. Nach einer experimentellen Depletion der Kupffer-Zellen konnten die intravenös injizierten transgenen Sporozoiten jedoch Hepatozyten infizieren. Die Parasiten besaßen demnach immer noch die Fähigkeit, Hepatozyten unter Ausbildung einer PV zu infizieren, aber nicht mehr zu transmigrieren (Bhanot et al., 2005; Ishino et al., 2006).

Erstaunlicherweise unterscheidet sich die Transmigration von Kupffer-Zellen von der darauf folgenden Transmigration von Hepatozyten. In den Kupffer-Zellen sind die transmigrierenden Sporozoiten von einer Membran umgeben. In Hepatozyten konnte die Ausbildung einer PV bei der Transmigration hingegen nicht beobachtet werden (Mota et al., 2002; Mota et al., 2001; Pradel and Frevert, 2001). Warum die Sporozoiten überhaupt durch einige Hepatozyten transmigrieren, bevor sie schließlich einen finalen Hepatozyten infizieren, ist noch nicht vollständig verstanden und wird gegensätzlich diskutiert. Auf der einen Seite führt die Migration zu einer Verwundung der transmigrierten Hepatozyten, welche darauf mit der Ausschüttung des Signalmoleküls HGF (hepatocyte growth factor) reagieren. Es wird vermutet, dass die benachbarten Hepatozyten hierdurch über einen HGF/MET Signalweg und die Aktivierung des anti-apoptotischen PI3-Kinasesignalwegs vor Apoptose geschützt und für eine Infektion empfänglicher gemacht werden (Carrolo et al., 2003; Leiriao et al., 2005a). Weiterhin wird vermutet, dass die Transmigration bei den Sporozoiten zu einer erhöhten Exozytose von apikalen Proteinen führt, die für die spätere Infektion des finalen Hepatozyten benötigt werden (Kumar et al., 2007; Mota et al., 2002). Auf der anderen Seite konnte jedoch bei den oben erwähnten transmigrationsdefizienten SPECT 1 und SPECT 2 Deletionsmutanten kein Unterschied bei der Infektion von Hepatozyten im Vergleich mit Wildtypparasiten beobachtet werden. Die Transmigration von Hepatozyten ist für die Parasiten somit nicht essentiell (Amino et al., 2008; Ishino et al., 2005b; Ishino et al., 2004).

Nach der Transmigration mehrerer Zellen infiziert ein Sporozoit schließlich einen Hepatozyten unter Ausbildung einer PV. Es konnte gezeigt werden, dass die Sporozoiten durch die in hoher Konzentration in der Leber vorkommenden stark sulfatierten HSPGs für diesen Infektionsmodus aktiviert werden (Coppi et al., 2007). Eine oben bereits erwähnte aktuelle Studie zu diesem Thema lieferte neue Erkenntnisse zu der Rolle, die CSP hierbei zukommt (Coppi et al., 2011). Bisher wurde vermutet, das die Sporozoiten über die Bindung des TSR- (Typ 1 thrombos-pondinrepeat) Motifs von CSP an HSPGs in der Leber adhärieren. Die aktuelle Studie konnte jedoch zeigen, dass das TSR-Motif von CSP erst nach dem Kontakt mit dem Hepatozyten durch proteolytische Spaltung freigelegt wird (Coppi et al., 2011). CSP tritt demnach an verschiedenen Punkten der Parasitenentwicklung in unterschiedlichen Konformationen auf. Bei der Sporozoitenentwicklung in der Mücke sowie bei der Invasion der Hepatozyten besitzt CSP eine "adhäsive" Konformation, in welcher das TSR-Motiv nicht maskiert ist ("Invasions-Modus"). Bei der Migration der Sporozoiten hingegen wird das adhäsive TSR-Motif durch eine N-terminale Region maskiert

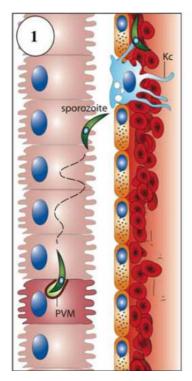
("Migrationsmodus"). Mutierte Parasiten, die nur CSP mit unmaskiertem TSR-Motif exprimierten, waren nicht mehr in der Lage, die Inokulationsstelle in der Haut zu verlassen. Stattdessen entwickelten sich diese Parasiten in der Haut zu exerythrozytären Stadien und waren in der Lage, von dort aus eine Blutinfektion zu etablieren (Coppi et al., 2011).

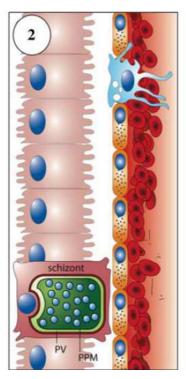
In der Leber erfolgt der erste Kontakt der Sporozoiten mit den Hepatozyten demnach vermutlich über den N-Terminus von CSP mit den HSPGs, was zu einer anschließenden proteolytischen Abspaltung des N-Terminus führt. Dadurch wird das TSR-Motif freigelegt, was die Invasion der Sporozoiten in die Hepatozyten ermöglicht (Coppi et al., 2011).

Die Parasitenentwicklung im Hepatozyten

Für die Infektion einer Leberzelle ist es erforderlich, dass der Sporozoit fest an einen Hepatozyten bindet. Dies geschieht ebenfalls durch Adhäsionsproteine des Sporozoiten sowie Oberflächenproteine der Wirtszelle. Einige der hierfür wichtigen charakterisierten Proteine sind CSP, TRAP und AMA-1 (apical membrane antigen 1) sowie, neben den bereits erwähnten HSPGs, das Tetraspanin CD81 und LRP auf der Wirtszellseite (Pinzon-Ortiz et al., 2001; Shakibaei and Frevert, 1996; Silvie et al., 2004; Silvie et al., 2003). Anschließend erfolgt eine Einstülpung der Wirtszellmembran, durch die sich der Parasit in die Wirtszelle bewegt, so dass der Parasit in der Wirtszelle schließlich vollständig von einer Membran umgeben ist, die aus der Zellmembran der Wirtszelle besteht (Abb. 1.5). Diese Membran, auch parasitophore Vakuolenmembran (PVM) bezeichnet, wird vom Parasiten modifiziert. Über die Proteinund Lipidzusammensetzung der PVM ist noch relativ wenig bekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Parasitenproteine Expl, UIS3 und UIS4 in der PVM lokalisiert sind und dass kleine Poren in die PVM eingebaut werden, die der Aufnahme kleiner Nährstoffmoleküle (< 855 Da) aus der Wirtszelle dienen könnten (Bano et al., 2007; Mueller et al., 2005a; Mueller et al., 2005b; Simmons et al., 1987; Sturm et al., 2009). Die Deletion des uis3- bzw. uis4-Gens arretiert die Parasitenentwicklung bereits in der frühen Leberphase (Mueller et al., 2005a; Mueller et al., 2005b).

Ungefähr 20 h nach Infektion der Wirtszelle beginnt der Parasit mit der Zellkernteilung unter Bildung eines vielkernigen Synzytiums, dem sogenannten Schizonten. Dabei weisen die Plasmodiumparasiten eine der schnellsten bei Eukaryoten beobachteten Replikationsraten auf und generieren innerhalb weniger Tage mehrere 10.000





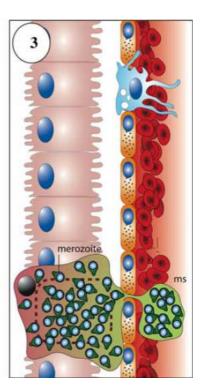


Abb. 1.5: Die Leberphase von Plasmodium

1) Sporozoiten adhärieren an den Epithelzellen der Lebersinusoide und gleiten das Epithel entlang bis sie auf eine Kupffer-Zelle (Kupffer cell, Kc) stoßen. Sie transmigrieren die Kc, passieren den Disseschen Raum und dringen anschließend ins Lebergewebe ein. Nach Transmigration einiger Hepatozyten infizieren die Sporozoiten schließlich einen Hepatozyten unter Ausbildung einer PV. 2) Innerhalb der PV entwickeln sich aus einem Sporozoiten über ein vielkerniges Schizontenstadium bis zu 30.000 Merozoiten. Sowohl Parasit als auch die Wirtszelle nehmen dabei enorm an Größe zu. 3) Am Ende der Leberphase wird die PVM degradiert, die Merozoiten gelangen ins Wirtszellzytosol und die Wirtszelle durchläuft einen ungewöhnlichen Zelltod. Es kommt zur Ablösung der Wirtszelle aus dem Zellverband und Merozoiten-gefüllte Ausstülpungen der Wirtszelle (Merosomen, ms) werden über die Lebersinusoide ins Blut abgeschnürt. Quelle: (Heussler et al., 2010)

Tochtermerozoiten (Baer et al., 2007a; Bano et al., 2007; Heussler et al., 2010). Der Leberschizont vergrößert sich hierbei um ein Vielfaches. Es konnte bisher noch nicht geklärt werden, wie die Parasiten die DNA- und Lipidbausteine sowie ausreichend Nährstoffe für diese enorme Wachstumsphase beziehen. Der Parasit wird in der Zelle lediglich vom endoplasmatischen Retikulum (ER) der Wirtszelle umgeben. Weiterhin besitzt der Parasit, wie oben erwähnt, Poren in der PVM, die es Ionen und kleinen Molekülen wie Monosacchariden und Aminosäuren ermöglichen könnten, in die PV zu gelangen (Bano et al., 2007; Sturm et al., 2009). Auch scheinen die Parasiten in einer noch nicht geklärten Weise mit dem Wirtszell-Apolipoprotein ApoA1 zu interagieren. ApoA1 ist 24 h nach Infektion an der PV lokalisiert und es wird vermutet, dass es dort mit dem UIS4-Protein interagiert. Es ist durchaus denkbar, dass ApoA1, welches ein wichtiges Protein für den Lipidstoffwechsel des Säugerwirts darstellt, auch eine Funktion bei Synthese zusätzlichen Membranmaterials in *Plasmodium*-infizierten

Zellen übernimmt (Prudencio et al., 2006). Vor allem in der späten Phase der Leberstadienentwicklung spielt der Fettsäuremetabolismus des Parasiten eine essentielle Rolle. Diese Erkenntnis ist für die Vakzineforschung höchst interessant, da über die Deletion von Genen, die am Parasitenfettsäuremetabolismus beteiligt sind, spät attenuierte Parasiten hergestellt werden können (Pei et al., 2010; Vaughan et al., 2009a; Vaughan et al., 2009b; Yu et al., 2008). Plasmodium besitzt die Fähigkeit, in seinem Apikoplasten, einem Plastid endosymbiontischen Ursprungs, Fettsäuren de novo zu synthetisieren. Die Deletion von Enzymen, die an diesen Prozessen beteiligt sind, beeinträchtigt das Wachstum der Parasiten zwar weder in der Blut-, noch in der Mücken- oder der frühen Leberphase. In der späten Leberphase kommt es jedoch zu einem Arrest der Parasitenentwicklung, wie in verschiedenen Studien mit P. berghei und P. yoelii, den Erregern der Nagetiermalaria, gezeigt werden konnte. Interessant war dabei, dass nach einer Deletion der Gene fabb/f, fab/z, pdh-e1α oder pdh-e3 in P. yoelii keine Entwicklung von Merozoiten beobachtet werden konnte. Nach der Deletion des fabl-Gens in P. berghei konnte hingegen noch vereinzelt eine Merozoitenentwicklung beobachtet werden, was auf mögliche Unterschiede zwischen den beiden Parasitenspezies hindeutet (Pei et al., 2010; Vaughan et al., 2009a; Vaughan et al., 2009b; Yu et al., 2008) und was weiterhin zeigt, dass für die mögliche Herstellung einer sicheren Lebendvakzine eine Einzelattenuierung nicht ausreicht.

Plasmodiumparasiten beeinflussen und verändern während ihrer Entwicklung ihre Wirtszellen. Auf welchem Weg dies in der Leberphase geschieht, ist noch weitgehend unbekannt. Da bei Blutstadienparasiten die Struktur- und Funktionsveränderung der roten Blutzellen unter anderem durch den Export verschiedenster Parasitenproteine in die Wirtszelle ermöglicht wird (Haldar et al., 2002; Maier et al., 2009), war die Frage, ob eine solche Exportmaschinerie auch in der Leberphase existiert. Tatsächlich wurde postuliert, dass Parasiten der Leberphase CSP in das Wirtszellzytosol exportieren können (Singh et al., 2007). CSP besitzt eine für diesen Export wichtige Signalsequenz, das PEXEL-Motiv (auch vacuolar translocation signal, VTS), welches auch bei vielen exportierten Proteinen zu finden ist, die während des Blutstadiums exprimiert werden (Horrocks and Muhia, 2005). Weiterhin weist CSP eine Kernlokalisationssequenz (nuclear localization signal, NLS) auf (Singh et al., 2007). Über das NLS gelangt CSP in den Kern der Wirtszelle. Dort soll CSP indirekt die Transkription NFκB-regulierter Wirtszellgene hemmen, unter anderem solcher, die an inflammatorischen Reaktionen beteiligt sind und begünstig somit die Entwicklung der Leberstadienparasiten. Da CSP in das Wirtszellzytosol exportiert wird, kann es von der Wirtszelle prozessiert und über MHC-Klasse-I-Komplexe auf der Wirtszelloberfläche

CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden. Diese können die infizierten Zellen daraufhin eliminieren. Dies ist eine der Eigenschaften, die CSP für die Vakzineforschung interessant machen (Singh et al., 2007).

Am Ende der Schizogonie kann eine Invagination der Parasitenplasmamembran (PPM) beobachtet werden. Zunächst entstehen hierdurch größere Gruppen von Parasitennuklei (Zytomerstadium). Durch weitere Invaginationen der PM werden schließlich einkernige Merozoiten gebildet, die jeweils von einer eigenen PPM umgeben sind. Neben der Verteilung der Zellkerne müssen auch die Organellen des Parasiten auf die einzelnen Merozoiten verteilt werden. Studien, die zu diesem Thema in unserem Labor durchgeführt wurden konnten zeigen, dass sowohl die Mitochondrien als auch die Apikoplasten zunächst als verzweigtes Netzwerk wachsen, bis schließlich einzelne Mitochondrien und Apikoplasten abgeschnürt werden (Stanway et al., 2011; Stanway et al., 2009). Die genauen Mechanismen werden derzeit erforscht.

Nach Abschluss der Merozoitenbildung kommt es zu einer Degradation der PVM, so dass sich die Merozoiten nun frei im Wirtszellzytosol bewegen (Graewe et al., 2011; Sturm et al., 2006; Sturm et al., 2009) Die Prozesse, die zur Degradation der PVM beitragen, und die daran beteiligten Proteine sind noch nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass an diesem Prozess Cysteinproteasen beteiligt sind, da in Experimenten unter Verwendung des Cysteinproteaseinhibitors E-64 die Degradation der PVM und alle daran anschließenden Prozesse verhindert werden konnten (Sturm et al., 2006). Weiterhin konnte durch die Deletion des Proteins LISP1 (*liver-specific protein 1*) die Auflösung der PVM am Ende der Leberphase verhindert werden. Die transgenen Parasiten bildeten vitale und infektiöse Merozoiten. Diese konnten die PVM jedoch nicht durchbrechen (Ishino et al., 2009).

Bis zum Ende der Leberphase unterdrückt der Parasit apoptotische Prozesse der Wirtszelle. Die genauen Hintergründe für dieses Phänomen sind noch nicht vollständig aufgeckt worden. (van de Sand et al., 2005). Es wurde allerdings vor kurzem in *P. berghei* ein Cysteinproteaseinhibitor (<u>P. berghei inhibitor of cysteine proteases</u>, PbICP) charakterisiert, der unter anderem die Eigenschaft besitzt, die Apoptose der Hepatozyten zu blockieren (Rennenberg et al., 2010). Nach der Auflösung der PVM jedoch stirbt die Wirtszelle einen ungewöhnlichen Zelltod, der zwar reguliert abläuft, dabei aber dennoch nicht alle Kriterien für eine Apoptose erfüllt. Die Wirtszelle rundet sich ab und löst sich aus dem Zellverband. Weiterhin kommt es zu einer Kondensation der Wirtszell-DNA, nicht jedoch zu deren Fragmentierung, wie es bei einer normalen Apoptose der Fall wäre. Die Mitochondrien setzen Cytochrom c frei (Sturm et al., 2006), was normalerweise zur Aktivierung einer Kaskade proteolytischer Enzyme, den Caspasen, führt, die die kontrollierte Degradation der Zellbestandteile bewirken. Bei

dem beobachteten ungewöhnlichen Tod der Wirtszelle kommt es jedoch nicht zu einer Caspase-Aktivierung (Sturm and Heussler, 2007). Ein weiterer Unterschied zur Apoptose ist die fehlende Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Wirtszellmembran (Sturm et al., 2006). PS, eine Phospholipid-Komponente von Zellmembranen, befindet sich in gesunden Zellen normalerweise nur auf der Innenseite der Zellmembran. Bei einer Apoptose wird die einseitige Membranverteilung von PS aufgehoben und PS gelangt auf die Außenseite der Zellmembran. Dadurch werden die apoptotischen Zellen von Makrophagen erkannt, die diese Zellen anschließend phagozytieren. Da bei den infizierten Hepatozyten die PS-Exposition auf der äußeren Wirtszellmembran jedoch durch die Parasiten verhindert wird, sind die Parasiten vor einer Phagozytose geschützt (Sturm et al., 2006).

Auf diese Weise vor dem Immunsystem des Wirtes geschützt, beginnen die Merozoiten die Leber zu verlassen. Dazu bilden sich vesikuläre, mit Merozoiten gefüllte Ausstülpungen in die benachbarten Blutgefäße der Lebersinusoide aus. Die Merozoiten-gefüllten Vesikel werden als Merosomen bezeichnet. Diese schnüren sich vom Rest des infizierten Hepatozyten ab und verlassen mit dem Blutstrom die Leber. In den Kapillaren der Lunge werden schließlich Merozoiten ins Blut freigesetzt. Dort werden rote Blutzellen von den Merozoiten invadiert und die Blutphase von *Plasmodium* beginnt (Baer et al., 2007a; Sturm et al., 2006).

1.1.3.3 Blutphase

In Abhängigkeit der *Plasmodium*-Spezies befallen die Merozoiten rote Blutzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Während *P. vivax* und *P. ovale* Retikulozyten (Vorläuferstadien der Erythrozyten) infizieren, befallen *P. malariae* Merozoiten nur ältere Erythrozyten. *P. falciparum* kann jedoch alle Stadien der roten Blutzellen infizieren (Garcia, 2010).

Nach der Anlagerung eines Merozoiten an seine Zielzelle, vermutlich unter anderem über Proteine der MSP (<u>merzoite surface protein</u>) Familie, erfolgt eine Umorientierung des Merozoiten auf der Oberfläche der roten Blutzelle. Dabei wird der apikale Pol des Merozoiten in einen engen Kontakt mit der Wirtszelloberfläche gebracht (*tight junction*). Diese Verbindung erfordert hochaffine Interaktionen zwischen Liganden- und Rezeptorproteinen. Ein Protein, welches auch bei diesem Prozess mitwirkt, ist AMA-1. Wie bereits erwähnt, übernimmt AMA-1 schon bei der Invasion infektiöser Sporozoiten in Hepatozyten eine Funktion. Nicht zuletzt wegen ihres Vorkommens in mehreren

Entwicklungsstadien von Plasmodium stellen MSP-1, das am stärksten vertretende Oberflächenprotein der Merozoiten, sowie AMA-1 interessante und wichtige Vakzinekandidaten dar (Cowman and Crabb, 2006; Mitchell et al., 2004). Unter Invagination der Wirtszellmembran folgt die Invasion des Parasiten in die rote Blutzelle, so dass auch hier der Parasit schließlich von einer PVM umgeben ist. In der Vakuole entwickelt sich der Parasit dann zu einem mehrkernigen Schizonten. In einer zentralen Nahrungsvakuole bauen die Parasiten das Hämoglobin der roten Blutzellen ab, um an die dabei freigesetzten Aminosäuren zu gelangen, die die Parasiten für die eigenen Wachstumsprozesse benötigen. Um der toxischen Wirkung des hierbei entstehenden Abbauproduktes Häm zu entgehen, polymerisieren die Parasiten das Häm zu dem nicht mehr toxischen kristallinen Hämozoin (Rosenthal and Meshnick, 1996). Die Hämdetoxifikation ist ein Angriffspunkt für einige Anti-Malariamedikamente, wie z.B. Chloroquin oder Artemisininderivate. Diese hemmen unter anderem die Häm-Polymerisation, so dass es zu einer Anreicherung des toxischen Häms in den Fressvakuolen der Parasiten und in Folge dessen zu einer Schädigung der Parasiten kommt (Greenwood et al., 2008; Pandey et al., 1999).

Abhängig von der Spezies entstehen bei der Schizogonie in den roten Blutzellen bis zu 32 Tochtermerozoiten. Diese werden durch eine Ruptur von PVM und Wirtszellmembran ins Blut entlassen, wo die Merozoiten sofort neue Blutzellen infizieren. Der gesamte Zyklus in der Blutzelle dauert je nach *Plasmodium*-Spezies zwischen 24 bis 72 h. Die synchron erfolgende Entlassung der Merozoiten ins Blut und die damit verbundene Freisetzung von Zelltrümmern roter Blutzellen löst eine starke Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF-α, IL-1 und IFN-γ, aus. Diese bewirken unter anderem die für eine Malaria charakteristischen Schübe mit hohem Fieber (Hafalla et al., 2011). Als ein starker Aktivator von Makrophagen wird in diesem Zusammenhang das *Plasmodium* Glykosylphosphatidylinositol (GPI) angesehen, welches auch als putatives "Malariatoxin" bezeichnet wird. Es wird angenommen, dass GPI, welches von den Parasiten in hohem Maße exprimiert wird, von Makrophagen über deren *Toll-like* Rezeptoren (TLR) erkannt wird und somit zur Induktion pro-inflammatorischer Immunantworten führt (Hafalla et al., 2011; Krishnegowda et al., 2005).

Einige *Plasmodium*-Merozoiten entwickeln sich nicht zu Schizonten, sondern zu den geschlechtlichen Formen. Werden diese von einer *Anopheles* Mücke aufgenommen, beginnt dort erneut die Mückenphase und der Kreis des Lebenszyklus von *Plasmodium* schließt sich.

1.1.4 Malaria-Forschung am Nagetiermodel

Die Leberphase von *Plasmodium* ist unter anderem für die Vakzineforschung höchst interessant. Während jedoch die Blutphase von *P. falciparum* relativ gut im Labor erforscht werden kann, ist das Arbeiten mit der Leberphase dieses Parasiten deutlich schwieriger. Vor einigen Jahren gelang es zwar, eine humane Hepatomazelllinie zu charakterisieren, die sich zur Kulivierung von *P. falciparum* Leberstadien *in vitro* eignet (Karnasuta et al., 1995). Fragen, unter anderem hinsichtlich immunologischer Interaktionen von Parasit und Wirt, können mit diesem System jedoch nicht beantwortet werden. Des Weiteren werden für derartige Versuche Mücken benötigt, die mit den humanpathogen *P. falciparum* Parasiten infiziert sind. Dies erfordert das Bereithalten eines Insektariums der Sicherheitsstufe 3.

Aus diesen Gründen wird zur Erforschung der Leberphase oftmals auf Tiermodelle zurückgegriffen. Für Laborzwecke eignen sich besonders die Modelle der Nagetiermalaria mit den Erregern *P. yoelii*, *P. chabaudi* und *P. berghei*, die in ihrer Morphologie, Physiologie und den entstehenden Krankheitssymptomen ein ähnliches Bild zur humanen Malaria liefern. Das Tiermodel bietet unter anderem gute Möglichkeiten Immunantworten und Vakzineeigenschaften bei einer *Plasmodium*-Infektion zu untersuchen (Hafalla et al., 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit *P. berghei* Parasiten gearbeitet, die erstmalig 1948 von Vincke und Lips beschrieben wurden (Vincke and Lips, 1948). Der natürliche Nagetierwirt dieser Parasiten ist die afrikanische Baumratte *Grammomys surdaster* (Vanderberg, 2009). Für die Kultivierung im Labor wurden hingegen NMRI-Mäuse verwendet.

Zur Herstellung infektiöser Sporozoiten wurden weibliche *Anopheles stephensi* Mücken durch eine Blutmahlzeit an *P. berghei* infizierten Mäusen infiziert. Die Sporozoiten konnten dann aus den Speicheldrüsen der Mücken isoliert werden. Für *in vitro* Versuche wurden die Sporozoiten zur Infektion humaner Hepatomazellen (HepG2) eingesetzt. *In vivo* Infektionen wurden mit Balb/c und C57BL/6 Mäusen durchgeführt, die jeweils eine unterschiedliche Empfänglichkeit hinsichtlich einer *Plasmodium* Infektion und unterschiedliche immunologische Grundlagen aufweisen (Scheller et al., 1994).

1.2 Immunität gegen Malaria

Menschen, die in Malaria-Endemiegebieten leben, entwickeln im Laufe vieler Jahre durch die ständige Neuinfektion mit den Malariaerregern eine Teil-Immunität ("Semi-Immunität"). Es wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei ausschließlich um eine Immunität gegen die Blutphase von Plasmodiumparasiten handelt, die jedoch nicht zu einer vollständigen Entfernung der Parasiten führt (Borrmann and Matuschewski, 2011).

Die ständige Neuinfektion mit Plasmodiumparasiten ermöglicht es dem Immunsystem, das Antikörperrepertoire gegen die polymorphen Parasitenproteine, die auf der Oberfläche von Merozoiten und von infizierten roten Blutzellen exprimiert werden, fortlaufend zu erweitern. Von großer Bedeutung ist hierbei vor allem die hochpolymorphe Familie der variant surface antigens (VSA) mit den Vertretern der Plasmodium falciparum Erythrozyten-Membranproteine (PfEMP), die von der großen Familie der var-Gene kodiert werden. Die natürliche Immunität kann bei einer vorliegenden Blutinfektion zu einer verringerten Ausprägung bzw. dem vollständigen Ausbleiben der typischen Malaria-Symptome führen. Da Anopheles Mücken bei einer Blutmahlzeit an solchen semi-immunen, aber infizierten Menschen trotzdem Parasiten aufnehmen können, stellen diese Menschen ein wichtiges Reservoir für die Verbreitung der Malaria dar (Bull et al., 1998; Hafalla et al., 2011).

Bei einer Schwangerschaft erlischt die Semi-Immunität zeitweise, da in der Plazenta ein neues Oberflächenprotein, Chondroitin Sulfat A, exprimiert wird, an welches die *P. falciparum* Parasiten über ihr Oberflächenprotein VAR2CSA binden können und auf diese Weise in der Plazenta sequestrieren. Dies kann zu schwerwiegenden Komplikationen bei der Schwangerschaft führen und hat Auswirkungen für die Mutter und das ungeborene Kind (Hafalla et al., 2011; Hviid, 2010).

Neben der erworbenen Semi-Immunität führen auch einige genetisch bedingte Veränderungen zu einer teilweisen Resistenz gegenüber einer schwer verlaufenden Malaria. Dazu zählen die erblich bedingte Veränderung der Hämoglobinstruktur (z.B. bei der Sichelzellanämie, HbS) bzw. der Hämoglobinsynthese (α/β -Thalassämie). Weiterhin führt auch ein Defekt im Erythrozytenstoffwechsel (Glukose-6-phosphat-Mangel) zu einem bis zu 50 % reduzierten Risiko, an einer schweren Malaria zu erkranken (Garcia, 2010).

Erstaunlicherweise entwickeln die Bewohner in den Malaria-Endemiegebieten keine vollständige natürliche Immunität gegen *Plasmodium*. Verschiedene Studien zu diesem Thema zeigten, dass Plasmodiumparasiten der Blutphase die Entwicklung einer

ausgeprägten Immunantwort gegen die Leberphase verhindern. Die genauen Vorgänge müssen noch aufgedeckt werden, aber es konnte bereits beobachtet werden, dass die Reifung von DCs von den Parasiten unterdrückt wird. Weiterhin produzieren die DCs bei einer *Plasmodium*-Infektion inhibitorische Zytokine wie TGF-β. Diese hemmen die Aktivität der gegen Leberstadienparasiten gerichteten CD8⁺ T-Zellen (Ocana-Morgner et al., 2003; Ocana-Morgner et al., 2007; Orengo et al., 2008).

Vor dem Hintergrund zunehmender Medikamentenresistenzen von *Plasmodium* sowie dem oben genannten Unvermögen der Patienten, auf natürlichem Wege eine vollständige Immunität gegen Malaria zu entwickeln, hat die Entwicklung einer wirkungsvollen Malariavakzine dementsprechend eine hohe Priorität.

1.2.1 Malariavakzine

Trotz großer Fortschritte in der Malariaforschung ist es bisher nicht gelungen, einen kommerziell erhältlichen Impfstoff gegen Malaria zu entwickeln. Prinzipiell existieren hierfür drei große Bereiche: Vakzine gegen die sexuellen Parasitenstadien, die asexuellen Blutstadien und gegen die exoerythrozytären Stadien (Abb. 1.6). Bei Impfstoffen gegen die sexuellen Blutstadien handelt es sich, wie bereits im Rahmen der Vektorkontrolle erwähnt (siehe 1.1.2), um altruistische Ansätze, da hiermit die Übertragung und Verbreitung der Parasiten verhindert wird, nicht jedoch die Vermehrung der Parasiten im Patienten.

Eine Immunisierung gegen Parasiten der Blutphase induziert vor allem CD4 T-Zellabhängige humorale Immunantworten. Die dabei produzierten Antikörper inhibieren zum einen die Infektion neuer Erythrozyten. Zum anderen blockieren sie die Erythrozyten Endothelzellen Sequestrierung infizierter an und stimulieren phagozytierende Zellen wie Makrophagen (Casares and Richie, 2009; Hafalla et al., 2011). Die Entwicklung von Blutphasen-Impfstoffen erweist sich jedoch aus verschiedenen Gründen als schwierig. Ein Problem ist der ausgeprägte Polymorphismus der Oberflächenproteine der infektiösen Blutstadienparasiten. Dieser führt dazu, dass Antikörper, die gegen ein bestimmtes Oberflächenprotein gebildet worden sind, schon nach kurzer Zeit keine Wirkung mehr zeigen, da die Parasiten eine neue Variante der Oberflächenproteine exprimieren. Dementsprechend wäre ein Impfstoff gegen eines dieser Proteine bereits nach kurzer Zeit wirkungslos. Ein weiteres Problem ist die große Anzahl an Parasiten in der Blutphase. Eine Vakzine

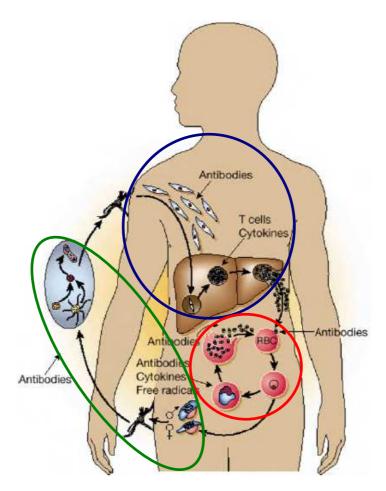


Abb. 1.6: Verschiedene Angriffspunkte für Malariavakzine

Antikörper gegen die **sexuellen** *Plasmodium* **Stadien** verhindern die Vermehrung der Parasiten in der Mücke (grün). In der **Blutphase** verhindern Antikörper unter anderem die Invasion der Merozoiten in rote Blutzellen sowie die Sequestrierung infizierter Erythrozyten an Endothelzellen und stimulieren phagozytierende Zellen (rot). In der **exoerythrozytären Phase** blockieren Antikörper die Invasion von Sporozoiten in die Leber. Weiterhin markieren Antikörper die Sporozoiten für phagozytierende Zellen. Infizierte Hepatozyten präsentieren Parasitenantigene über MHC I-Komplexe und werden hierüber von cytotoxischen T-Zellen erkannt und eliminiert (blau).

Abbildung modifiziert aus Quelle: (Casares et al., 2010)

müsste somit eine sehr starke Induktion der Antikörperproduktion bewirken, um eine vollständige Eliminierung der Parasiten im Blut erzielen zu können (Hviid, 2010; Kappe et al., 2010). Einige Blutstadienantigene werden trotz dieser Einschränkungen zurzeit in der klinischen Vakzineentwicklung hinsichtlich ihrer protektiven Eigenschaften untersucht. Zu den potentiellen Vakzinekandidaten gehören die Parasitenproteine AMA1, EBA-175 (erythrocyte-binding antigen-175), GLURP (glutamate-rich protein), MSP1 bis 3 und SERA5 (serine-repeat antigen 5). Ergebnisse aus Phase II Studien mit rekombinanten AMA1 bzw. MSPI Vakzinen zeigten jedoch leider keine Effizienz. Zurzeit wird untersucht, ob eine kombinierte Vakzine, die aus rekombinantem AMA1 und MSPI besteht, einen Impfschutz vermitteln kann (Crompton et al., 2010).

Die exoerythrozytären Stadien bzw. die **Leberphase** des Plasmodiumparasiten stellt hingegen aus mehreren Gründen einen attraktiven Ansatzpunkt zur Entwicklung von Malariaimpfstoffen dar. Die Entwicklung der Parasiten verläuft in der Leber, im Gegensatz zur Entwicklung im Blut, völlig ohne Symptome. Somit würde eine Immunisierung gegen die Leberphase des Parasiten die Entstehung der Krankheitssymptome verhindern. Ein weiterer Punkt ist die geringe Anzahl infizierter Hepatozyten, da nur ein Teil der ursprünglich inokulierten Sporozoiten tatsächlich bis zur Leber vordringt und dort eine Leberzelle infiziert. Eine vollständige immunologische Eliminierung der Parasiten ist somit in der Leberphase deutlich wahrscheinlicher als in der Blutphase (Borrmann and Matuschewski, 2011). Im Gegensatz zu den Erythrozyten sind Hepatozyten in der Lage, intrazelluläre Antigene zu prozessieren und diese auf ihrer Oberfläche über MHC-Klasse-I-Komplexe zu präsentieren. Die infizierten Zellen können auf diesem Weg von zytotoxischen T-Zellen erkannt und eliminiert werden (Hafalla et al., 2011).

Durch eine Unterbindung der Blutphase wird zudem der bereits beschriebene inhibitorische Effekt von Blutstadienparasiten auf DCs umgangen, welcher unter natürlichen Umständen die Entwicklung einer vollständigen Immunität verhindert (Ocana-Morgner et al., 2003; Ocana-Morgner et al., 2007; Orengo et al., 2008).

Im Folgenden werden einige Ansätze zur Vakzineherstellung gegen exoerythrozytäre *Plasmodium* Stadien beschrieben, die sich zurzeit bereits in prä-klinischen oder klinschen Studien befinden.

1.2.1.1 RTS,S - Vakzine

Der erste kurz vor einer Zulassung stehende Malariaimpfstoff ist RTS,S. Hierbei handelt es sich um einen rekombinanten, aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzten Impfstoff ("subunit Vakzine"), der gegen die exoerythrozytären Stadien von *Plasmodium* gerichtet ist. Als wirksame Komponente gegen Malaria enthält RTS,S das C-terminale Segment des *P. falciparum* CSP (Aminosäuren 207 bis 395). Die immunodominante Wirkung von CSP ist schon länger bekannt. So konnten experimentelle Immunisierungen ausschließlich mit CSP bereits eine teilweise Protektion hervorrufen (Nussenzweig and Nussenzweig, 1986a; Nussenzweig and Nussenzweig, 1986b). Das für die RTS,S-Vakzine ausgewählte CSP-Fragment enthält bekannte Epitope für B- (*repeat region*, R), CD4 und CD8 T-Zellen (T). C-terminal ist

es mit dem immunogenen Oberflächen- (S) Antigen des Hepatitis B Virus fusioniert (Cohen et al., 2010). Zur Verbesserung der immunogenen Wirkung wurde RTS,S in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien getestet. Gute Ergebnisse wurden dabei mit dem Liposomen basierten AS01E und dem "Öl-in-Wasser" basierten AS02E Adjuvants erzielt. In Impfstudien mit Kindern, welche die Hauptzielgruppe für spätere Vakzinierungen darstellen, konnte eine Reduzierung des Risikos, an einer schweren Malaria zu erkranken, beobachtet werden. Allerdings lag die Effizienz der Vakzine nur bei ca. 65 % (Aponte et al., 2007; Bejon et al., 2008). RTS,S/AS01E befindet sich derzeit in klinschen Studien der Phase III (WHO 2010).

Der protektive Mechanismus ist nicht vollständig geklärt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit RTS,S zu einer Produktion CSP-spezifischer Antikörper sowie einem vermehrten Auftreten IL-2- und TNF-α-produzierender CD4⁺ T-Zellen führt (Crompton et al., 2010; Lumsden et al., 2011).

1.2.1.2 Lebendimpfstoffe

Bei vielen der heutzutage verwendeten Impfstoffe handelt es sich um Lebendimpfstoffe (z.B. bei Typhus oder Tuberkulose). Die Krankheitserreger in diesen Impfstoffen sind stark abgeschwächt (attenuiert), so dass sie zwar noch metabolisch aktiv sind, aber keine Krankheitssymptome mehr hervorrufen können (Borrmann and Matuschewski, 2011).

Neben der im vorigen Abschnitt beschriebenen Entwicklung rekombinant hergestellter *subunit* Vakzine wird für die Malariaerreger auch die Entwicklung einer Lebendvakzine angestrebt. Hierzu existieren grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze.

Immunisierung mit bestrahlten Sporozoiten

Bereits in den 1960er Jahren konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung von Mäusen mit γ -bestrahlten Sporozoiten einen sterilen Schutz vor einer Infektion mit Wildtypsporozoiten erzeugt (Nussenzweig et al., 1967). Später konnte dieses auch für Affen und Menschen gezeigt werden (Clyde, 1975; Hoffman et al., 2002). Durch die Strahlung werden zufällige Mutationen sowie Brüche in der DNA der Parasiten erzeugt. Die Parasiten werden hierdurch zwar nicht getötet, können sich jedoch nicht mehr weiterentwickeln. Somit sind die bestrahlten Sporozoiten noch in der Lage,

Hepatozyten zu infizieren. Sie stellen ihre Entwicklung aber als Trophozoit oder sehr früher Schizont ein (Silvie et al., 2002). Die durch die Injektion bestrahlter Sporozoiten hervorgerufene Immunantwort ist komplex (Doolan and Hoffman, 2000). Hauptsächlich spielen für die spätere Protektion CD8⁺ T-Zellen, die die infizierten Hepatozyten erkennen und eliminieren, eine entscheidende Rolle. Aber auch CD4⁺ T-Zellen, Antikörper sowie IFN-γ und Stickoxid (NO) sind an der Immunantwort beteiligt (Doolan and Hoffman, 2000; Vaughan et al., 2009b).

Ein Problem bei der Herstellung effektiver und sicherer bestrahlter Sporozoiten zu Immunisierungszwecken ist die Einhaltung der korrekten Bestrahlungsdosis (Vanderberg et al., 1968). Eine zu geringe Dosis führt nicht zur vollständigen Attenuierung aller Parasiten in der Leberphase, so dass diese Parasiten die Leberphase beenden und somit die pathogene Blutphase erreicht wird. Eine zu hohe Bestrahlungsdosis führt hingegen zu einer massiven Schädigung der Parasiten-DNA, was zu einer geringeren Infektionsrate der Sporozoiten und zu einer verminderten Proteinbiosyntheseaktivität führt. Hierdurch wird kein ausreichender Schutz mehr gegen eine Infektion mit Wildtypparasiten erzeugt (Friesen and Matuschewski, 2011; Suhrbier et al., 1990; Vanderberg et al., 1968). Trotz dieser Schwierigkeiten hat sich die Firma Sanaria das Ziel gesetzt, einen Impfstoff bestehend aus γ-bestrahlten P. falciparum Sporozoiten herzustellen. Eine derartige Vakzine, PfSPZ, befindet sich aktuell in klinischen Studien der Phase II (Borrmann and Matuschewski, 2011; Luke 2009b). and Hoffman, 2003: Vaughan et al., Bei vorangegangenen Immunisierungsexperimenten, in denen Probanden über kumulative infektiöse Mückenstiche von mehr als 1.000 Mücken mit bestrahlten P. falciparum Parasiten immunisiert wurden, konnte eine sterile Protektion von mindestens 10 Monaten beobachtet werden. Hieraus wurde abgeleitet, dass die für eine sterile Protektion benötigte Dosis bei >100.000 bestrahlten Sporozoiten lag. Eine andere Studie im Nagetiermodel konnte hingegen zeigen, dass mit einer dreimaligen Dosis von nur jeweils 750 bestrahlten P. yoelii Sporozoiten Mäuse für mindestens zwei Wochen gegen eine Infektion mit Wildtypparasiten geschützt sind (Chattopadhyay et al., 2009). Weiterhin konnte im Nagetiermodel eine teilweise Kreuzprotektion bei Mäusen beobachtet werden, die mit bestrahlten P. berghei bzw. P. yoelii Sporozoiten immunisiert und anschließend heterolog mit Wildtypsporozoiten der jeweils anderen Spezies infiziert wurden (Sedegah et al., 2007).

Diese Studien bestätigen, dass es prinzipiell möglich ist, einen Lebendimpfstoff gegen Malaria herzustellen, der eine gute Protektion vermittelt.

Genetisch attenuierte Parasiten

Ein relativ neuer Ansatz zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen Malaria ist die Herstellung genetisch attenuierter Plasmodiumparasiten (GAP) in der exoerythrozytären Phase (Aly et al., 2008; Ishino et al., 2005b; Jobe et al., 2007; Labaied et al., 2007; Mueller et al., 2005a; Mueller et al., 2005b; Pei et al., 2010; Tarun et al., 2007; van Dijk et al., 2005; VanBuskirk et al., 2009; Vaughan et al., 2009a; Yu et al., 2008). Die Genomentschlüsselung und Transkriptomanalyse verschiedener *Plasmodium*-Spezies (Carlton et al., 2008; Carlton et al., 2002; Gardner et al., 2002; Hall et al., 2005; Tarun et al., 2008) ermöglichte die Suche nach stadienspezifisch exprimierten Genen, die für das Überleben der Parasiten essentiell sind.

In den Parasiten des Malaria-Nagetiermodells, P. berghei und P. yoelii, wurden zwei Gene untersucht, die in infektiösen Sporozoiten und zu Beginn der Leberphase exprimiert werden (uis3 und uis4; upregulated in infectious sporozoites). Bei uis3 und uis4 handelt es sich um kleine Transmembranproteine, die während der Leberphase in der PVM lokalisiert sind (Mueller et al., 2005a; Mueller et al., 2005b; Tarun et al., 2007). Die Deletion des uis3- bzw. des uis4-Gens hatte weder einen Einfluss auf die Blutphase, noch auf die Entwicklung der Parasiten in den Anopheles Mücken. Auch die Transmigration und die spätere Invasion in Hepatozyten wurden durch die Gendeletion nicht beeinträchtigt. Jedoch konnten sich die transgenen Parasiten in den Hepatozyten nicht vollständig entwickeln, sondern arretierten in ihrer Entwicklung bereits im Trophozoiten- bzw. teilweise im frühen Schizontenstadium (Mueller et al., 2005a; Mueller et al., 2005b; Tarun et al., 2007). Die Immunisierung von Mäusen mit den attenuierten Parasiten führte zu einem sterilen Schutz vor einer Infektion mit Wildtypsporozoiten (challenge), nicht iedoch vor einer Infektion Blutstadienparasiten. Weiterhin konnte nach der Injektion hoher Immunisierungsdosen von uis4-deletierten Sporozoiten teilweise die Entwicklung einer Blutinfektion ("breakthrough") beobachtet werden (Mueller et al., 2005a). Durch die Kombination von uis3- und uis4-Gendeletion (doppelte Attenuierung) wurde die Entwicklung der Parasiten in der Leberphase jedoch vollständig blockiert und die Immunisierung von Mäusen mit diesen doppelt attenuierten Sporozoiten führte zu einer sterilen Protektion vor einer Infektion mit Wildtypsporozoiten (Jobe et al., 2007). Diese Versuche zeigten, dass es ebenfalls möglich ist, Malaria-Lebendimpfstoffe in Form genetisch attenuierter Parasiten herzustellen, wobei eine doppelte Attenuierung eine größere Sicherheit gegenüber einer Einzelattenuierung bietet.

Neben *uis3* und *uis4* wurden in anderen Studien zwei weitere Gene deletiert, die von infektiösen Sporozoiten exprimiert werden, *p52* (auch *p36p*) und *p36* (Ishino et al.,

2005b; van Dijk et al., 2005). Die transgenen Parasiten entwickelten sich in der Blutphase und im Mückenstadium normal. Jedoch kam es bei der Infektion von Hepatozyten zu schweren Defekten. Die Parasiten besaßen bzw. entwickelten keine PVMund waren somit dem Zytosol der Wirtszelle und deren Proteindegradationsmaschinerie direkt ausgesetzt. Die Persistenz der transgenen Parasiten in den Hepatozyten war relativ kurz (<24 h), was auf eine erhöhte Apoptoserate infizierter Hepatozyten zurückgeführt wurde (Ishino et al., 2005b; van Dijk et al., 2005). Die Immunisierung mit den einfach attenuierten p52 - und p36-Sporozoiten vermittelte einen sterilen Impfschutz, jedoch kam es bei beiden Parasitenlinien teilweise zu breakthrough Infektionen und der damit verbundenen pathogenen Blutphase. Durch die simultane Deletion von p52 und p36 konnten die transgenen P. berghei Parasiten vollständig in der Leberphase arretiert werden (Labaied et al., 2007). Die Deletion von p52 und p36 in den humanpathogenen P. falciparum Parasiten führte auch bei diesen zu einer vollständigen Attenuierung in der Leberphase. Allerdings konnte beobachtet werden, dass die doppelt attenuierten Parasiten früher in der Leberphase arretierten, als es bei den Einzeldeletionen der Fall war (VanBuskirk et al., 2009). Die P. falciparum p52-/p36-Parasiten befinden sich derzeit in klinischen Phase I Studien (Borrmann and Matuschewski, 2011).

Die Deletion des *Plasmodium* Gens sap1 (sporozoite asparagine-rich protein1) führt ebenfalls zu einer sehr frühen Attenuierung der Parasiten in der Leberphase (Aly et al., 2008). Die transgenen Parasiten waren in der Lage, die Hepatozyten normal unter Ausbildung einer PVM zu infizieren, konnten sich aber nicht darüber hinaus weiterentwickeln. Die Immunisierung von Mäusen mit diesen Parasiten erzeugte einen lang anhaltenden Schutz (mind. 210 Tage). Eine interessante Beobachtung nach der Deletion von sap1 war die ebenfalls fehlende Expression von UIS3, UIS4 und p52 in den transgenen Parasiten. Somit wurde durch die sap1-Deletion eine Art "Mehrfach-Attenuierung" in den Parasiten erzeugt (Aly et al., 2008; Vaughan et al., 2009b).

Eine Immunisierung mit früh attenuierten transgenen Parasiten kann demnach bereits einen sterilen Schutz vor einer Infektion mit Wildtypsporozoiten bewirken. Es wird jedoch vermutet, dass spät attenuierte Parasiten ein umfassenderes Antigenrepertoire liefern, was in einer größeren und besseren Immunantwort resultieren könnte (Borrmann and Matuschewski, 2011; Hafalla et al., 2011). Gestützt werden diese Vermutungen durch die Ergebnisse aus Studien, in denen Mäuse (Belnoue et al., 2004; Belnoue et al., 2008) und menschliche Probanden (Roestenberg et al., 2011) mit lebenden *Plasmodium*-Sporozoiten infiziert wurden. Eine gleichzeitige Behandlung der Mäuse bzw. Probanden mit dem Malariamedikament Chloroquin eliminierte die Parasiten im Blut, nachdem diese die Leberphase vollständig zu durchlaufen hatten.

Sowohl die menschlichen Probanden als auch die Mäuse waren vollständig gegen einen anschließenden *challenge* mit virulenten Wildtypsporozoiten geschützt (Belnoue et al., 2008; Roestenberg et al., 2011). Bemerkenswert war, dass die Mäuse auch gegen eine Infektion mit Blutstadienparasiten geschützt waren (Belnoue et al., 2008). Die durch diese Vakzinierung erzeugte Immunantwort war sowohl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell- als auch antikörperabhängig. Hieraus wurde geschlossen, dass ein umfassender Malaria-Impfschutz durch eine Immunantwort gegen Antigene erzielt werden kann, die sowohl in der (späten) Leberphase als auch in der Blutphase vorkommen (Belnoue et al., 2008). Dementsprechend galt es, genetisch attenuierte Parasiten herzustellen, die spät in der Leberphasenentwicklung arretieren und zu analysieren ob eine Infektion mit diesen Parasiten einen hinreichenden Impfschutz bietet.

Wie bereits erwähnt, konnten Studien mit *P. berghei* und *P. yoelii* Parasiten zeigen, dass die Deletion verschiedener Gene, die an der *de novo* Fettsäuresynthese im Apikoplasten der Parasiten beteiligt sind, zu einer Attenuierung in der späten Leberphase führt (Pei et al., 2010; Vaughan et al., 2009a; Yu et al., 2008). Der Pyruvatdehydrogenase-Enzymkomplex (PDH), welcher in *Plasmodium* nur im Apikoplasten lokalisiert ist, katalysiert die Bildung der für die Fettsäuresynthese benötigten Acetyl-Bausteine (Abb. 1.7). Die Deletion der E1α- bzw. der E3-Untereinheit der PDH führte in *P. yoelii* zu einer vollständigen Attenuierung der transgenen Parasiten in der späten Leberphase sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die Parasiten entwickelten sich zwar zu größeren Schizonten, bildeten jedoch kein Mspl, ein Membranprotein der späteren Merozoiten (Pei et al., 2010).

Weiterhin sind an der Fettsäuresynthese vier Schlüsselenzyme beteiligt (FabB/F, FabG, FabZ und FabI; Abb. 1.7), welche die Elongation der Fettsäuren katalysieren (Tarun et al., 2009). Die Deletion von FabI führte in *P. berghei* zu einem Wachstumsdefekt in der späten Leberphase. Die Parasiten entwickelten sich zwar noch zu Schizonten, wiesen jedoch eine reduzierte Anzahl an Nuklei auf. Dennoch konnten *in vitro* vereinzelt Merozoiten beobachtet werden. Auch bei Infektionen von Mäusen mit *fabI*-Parasiten kam es teilweise zu *breakthrough* Infektionen (Yu et al., 2008). Die Deletion von FabB/F und FabZ in *P. yoelii* führte hingegen zu einer vollständigen Attenuierung der Parasiten in der späten Leberphase (Vaughan et al., 2009a).

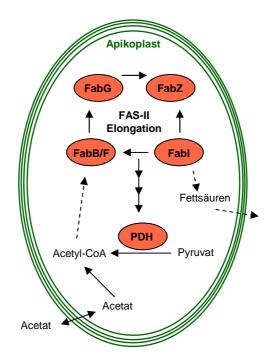


Abb. 1.7: Schlüsselenzyme des Fettsäuremethabolismus im Apikoplasten (Schema)
PDH katalysiert die Bildung von Acetyl-Bausteinen, die von FabB/F, FabG, FabZ und Fabl für die Synthese von Fettsäuren benötigt werden. Die Deletion dieser Enzyme führt zur Attenuierung der Plasmodiumparasiten in der späten Leberphase.
Abbildung modifiziert aus Quelle: (Tarun et al., 2009)

In einer vergleichenden Studie von RAS, *sap1*- und *fabb/f*-Parasiten wurde daraufhin erstmalig untersucht, ob es Unterschiede bei der Immunisierung mit früh und spät attenuierten Parasiten sowie bestrahlten Sporozoiten gibt (Butler et al., 2011). Die spät attenuierten *fabb/f*-Parasiten zeigten im Vergleich zu den anderen attenuierten Parasiten einen besseren Impfschutz, sowohl hinsichtlich der Immunisierungsdosen als auch hinsichtlich der Dauer der Protektion. Mit *P. yoelii fabb/f*-Sporozoiten immunisierte Mäuse waren gegen eine Infektion mit *P. berghei* Sporozoiten geschützt (Kreuzprotektion). Weiterhin waren die immunisierten Mäuse auch gegen eine Infektion mit *P. yoelii* Blutstadien geschützt (Butler et al., 2011).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die große Bedeutung spät attenuierter Plasmodiumparasiten für die Verwendung als Lebendvakzine sowie für die bessere Charakterisierung der protektiven Immunantwort.

1.3 Porenformende Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit sollten transgene, genetisch attenuierte *P. berghei* Parasiten hergestellt werden, die die späte Leberphase erreichen, sich aber nicht darüber hinaus entwickeln können. Es wurde angenommen, dass die vorzeitige Lyse der PVM für die Leberstadienparasiten letal ist. Aus diesem Grund sollte die PVM durch die exogene Expression porenformender Proteine perforiert werden, um die Attenuierung der Parasiten zu erreichen. Die Expression der porenformenden Proteine sollte unter der Kontrolle eines leberstadienspezifischen Promotors erfolgen.

Sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten sind porenformende Proteine (auch *pore-forming toxins*, PFTs) weit verbreitet. Über 80 verschiedene Familien von PFTs wurden bisher charakterisiert und bei ungefähr einem Drittel aller bakteriellen Toxine handelt es sich um PFTs (Rosado et al., 2008).

PFTs werden als hydrophile Monomere exprimiert, die durch eine Änderung ihrer Konformation lipophile Bereiche freilegen können. Diese lipophilen Abschnitte des Moleküls können mit der Lipiddoppelschicht von Plasmamembranen wechselwirken und in sie eindringen. Durch eine ringförmige Oligomerisierung mehrerer PFT-Monomere wird so eine Transmembranpore erzeugt. Dabei können Poren mit einem Durchmesser von bis zu 50 nm entstehen, die aus bis zu 50 monomeren Untereinheiten bestehen (Rosado et al., 2008; Tilley and Saibil, 2006).

PFTs lassen sich anhand der Molekülstrukturen, die die Transmembranporen erzeugen (α -Helizes oder β -Faltblätter) in α - und β -PFTs eingruppieren. Die β -PFTs sind bezüglich ihrer Struktur und des porenformenden Mechanismus am besten charakterisiert. Die Superfamilie der *membrane attack complex/perforin/cholesterol-dependent cytolysins* (MACPF/CDC) ist eine der größten β -PFT-Familien (Rosado et al., 2008). Auf diese wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.3.1 MACPF-Proteine

MACPF-Proteine stellen eine große Gruppe eukaryotischer porenformender Proteine dar. Die Bezeichnung MACPF leitet sich aus der strukturellen Ähnlichkeit der MACPF-Domäne zu Domänen des <u>membrane attack complex</u> (MAC) und Perforins (PF) ab. MACPF-Proteine dienen unterschiedlichsten Aufgaben. So besitzen verschiedene Komponenten des humanen Komplementsystems eine MACPF-Domäne, um

bakterielle Pathogene zu zerstören. Auch das humane Perforin, welches von natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten gebildet wird, besitzt porenformende Eigenschaften, die für die Lyse Virus-infizierter Zellen benötigt werden (Rosado et al., 2008).

Bei den *Apikomplexa* wurden ebenfalls Proteine gefunden, die eine MACPF-Domäne aufweisen. *Toxoplasma* besitzt zwei, *Plasmodium* sogar fünf verschiedene Proteine mit einer solchen Domäne (Kafsack and Carruthers, 2010). Für TgPLP1 (*perforin-like protein*) (Kafsack et al., 2009) sowie für die *Plasmodium* Proteine SPECT 2 (auch PLP1) (Ishino et al., 2005a; Kaiser et al., 2004) und MAOP (*membrane-attack ookinete protein*) (Kadota et al., 2004) konnte eine Lokalisation in den Mikronemen nachgewiesen werden. Diese sekretorischen Organellen spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Invasion und der gleitenden Fortbewegung der Parasiten.

MAOP wird in der Mückenphase von Plasmodium von Ookineten exprimiert. Deletionsmutanten, die kein MAOP mehr exprimierten, waren nicht mehr in der Lage dass Mitteldarmepithel zu transmigrieren (Kadota et al., 2004). Eine vergleichbare Hemmung der Transmigration infektiöser Sporozoiten konnte bei SPECT 2-Deletionsmutanten beobachtet werden. Die Infektion von Zellen war hingegen noch 2005b). Neben essentiellen Funktionen bei möglich (Ishino et al., Zelltransmigration scheinen einige porenformende Proteine auch für das Verlassen der PVM bzw. der Wirtszelle essentiell zu sein. Die Deletion von Tgplp1 führte dazu, dass die Parasiten ihre Wirtszellen nicht mehr verlassen konnten und resultierte in vivo in einer starken Abnahme der Virulenz. Es wurde vermutet, dass die Deletionsmutanten auf Grund fehlender porenformender Proteine nicht mehr in der Lage waren, die PVM schnell genug zu permeabilisieren. (Kafsack et al., 2009).

Auch bei *Plasmodium* ist eine Funktion porenformender Proteine für das Verlassen der Wirtszelle denkbar. *Plasmodium* PLP2 wird in intraerythrozytären Parasiten und PLP5 in Gametozyten exprimiert. Diese Stadien erfordern keine Transmigration. Es ist vielmehr wichtig, dass die Parasiten ihre Wirtszellen am Ende der Entwicklung erfolgreich verlassen können. Inwiefern hierfür porenformende Proteine mitverantwortlich sein könnten, muss allerdings noch erforscht werden (Kafsack and Carruthers, 2010).

1.3.2 Cholesterol-dependent cytolysins - CDCs

Wie der Name impliziert, benötigen PFTs dieser Familie Cholesterin, um ihre porenformende Wirkung zu entfalten. Cholesterin, ein lipophiles Sterol, ist ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen. Es wird vermutet, dass Cholesterin für viele Proteine der CDCs unter anderem als Rezeptor fungiert, um eine Anlagerung von CDC-Monomeren an Membranen zu ermöglichen (Soltani et al., 2007).

In Abbildung 1.8 ist schematisch die Bildung einer Membranpore am Beispiel des CDC-Proteins Listeriolysin (LLO) dargestellt. Bei einem sauren pH-Wert baut die Cterminale Domäne (D4) den Kontakt des LLO-Monomers zur Zielmembran auf, vermutlich über Cholesterin. Nach der Membranbindung führt Konformationsänderung des LLO-Monomers dazu, dass sich weitere LLO-Monomere anlagern können. Diese Oligomerisierung mehrerer LLO-Monomere führt zur Ausbildung genannten *pre-pore* Komplex. Durch eines SO eine Konformationsänderung werden β-Faltblattstrukturen des *pre-pore* Komplex schließlich in die Zielmembran hineingeschoben. Auf diese Weise wird eine Transmembranpore gebildet. Die genauen Prozesse der Porenbildung sind noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wird Cholesterin auch bei diesen Prozessen eine wichtige Funktion zugesprochen (Hamon et al., 2006; Heuck et al., 2007; Rosado et al., 2008).

Die fakultativ intrazellulär lebenden *Listeria monocytogenes* Bakterien sind neben *Listeria ivanovii* die einzigen bekannten Bakterien, die ihr porenformendes Toxin, LLO, innerhalb der Wirtszelle sekretieren (Rosado et al., 2008). *L. monocytogenes* Bakterien gelangen passiv über Phagozytose in die Wirtszellen. Dabei können die Bakterien in einer großen Bandbreite von Zelltypen eine Infektion etablieren. Innerhalb der Zelle befreien sie sich aus dem Phagosom und gelangen ins Zytoplasma der Zelle. Dieses wird ihnen ermöglicht, indem sie sowohl Phospholipasen als auch LLO sekretieren, die die Membran des Phagosoms lysieren. Um die Wirtszelle dabei nicht zu zerstören, hat *L. monocytogenes* einen ausgeklügelten Mechanismus entwickelt. LLO ist nur bei einem sauren pH-Wert (< 6), wie er im Phagosom herrscht, aktiv (Abb. 1.8). Nach der Lyse des Phagosoms wird das LLO aufgrund des in der Zelle herrschenden neutralen pH-Werts inaktiviert (Hamon et al., 2006).

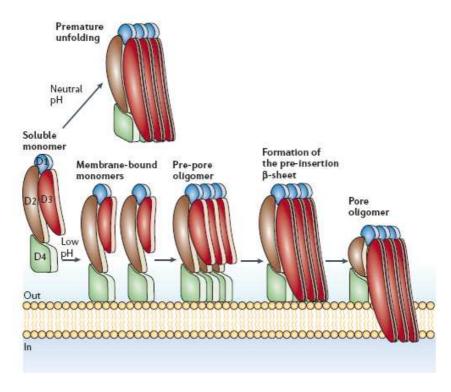


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Porenbildung von Listeriolysin (LLO)
Bei saurem pH-Wert kommt es zur Bildung einer Transmembranpore durch LLO. Bei neutralem pH-Wert nimmt das LLO-Monomer jedoch eine Konformation ein, die die Bildung einer Transmembranpore verhindert. (Einzelheiten siehe Text)
Quelle: (Hamon et al., 2006)

Wie wichtig diese Regulation für die Bakterien ist, konnte in einem Versuch gezeigt werden, bei dem genetisch manipulierte L. monocytogenes Bakterien anstelle von LLO das porenformende Toxin Perfringolysin O (PFO) exprimierten. PFO wird eigentlich von gram-positiven Clostridium perfringens Bakterien produziert und ist sowohl im sauren als auch bei einem neutralen pH-Wert aktiv. Neben der Lyse des Phagosoms und der daraus resultierenden Freisetzung der Bakterien ins Wirtszellzytoplama wurde in diesem Fall auch die aus Sicht von L. monocytogenes unerwünschte Lyse der Wirtszelle beobachtet (Jones and Portnoy, 1994). Dieser Effekt ist durch die unterschiedliche Lebensweise der beiden Bakterien zu erklären. Während sich L. monocytogenes intrazellulär vermehren, leben C. perfringens extrazellulär und sekretieren PFO, um ihre Invasion in Gewebe zu erleichtern. Dabei kommt es zu einer Schädigung von Plasmamembranen und der damit verbundenen Nekrose der Zellen (Rosado et al., 2008). Weiterhin verwenden C. perfringens Bakterien PFO vermutlich auch, um nach einer Phagozytose durch Makrophagen aus dem Phagosom zu entkommen (O'Brien and Melville, 2004). Die Molekülstruktur von PFO war die erste aufgeklärte Struktur eines CDCs (Rossjohn et al., 1997). Wie beim LLO besteht auch ein PFO-Monomer aus 4 Domänen, wovon die C-terminale Domäne (D4) Bereiche enthält, die die Bindung an Cholesterol vermitteln. PFO oligomerisiert zu Porenkomplexen aus 20 bis 50 Monomeren was in einem späteren Porendurchmesser von 25 bis 30 nm resultiert. Die Bindung an geordnete Lipidstrukturen in der Zellmembran (*lipid rafts*) ist für die Porenbildung von PFO dabei vermutlich nicht essentiell (Nelson et al., 2008).

Da gezeigt wurde, dass auch die PVM von *Plasmodium* Leberstadien cholesterinreich ist (Bano et al., 2007; Silvie et al., 2008), stellt die sie einen guten Angriffspunkt für PFO dar. Weiterhin ist PFO, im Gegenstaz zu LLO, auch in einer pH-neutralen Umgebung, wie sie in der PV vorliegt, aktiv (Jones and Portnoy, 1994). Diese Voraussetzungen machen PFO zu einem geeigneten Toxin-Kandidaten für die im Rahmen dieser Arbeit angestrebte Herstellung genetisch attenuierter *P. berghei* Parasiten.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zur Herstellung genetisch attenuierter P. berghei Parasiten eine neue Methode etabliert werden, bei der die Parasiten mittels stadienspezifischer Expression eines toxisch wirkenden Proteins in der späten Leberphase eliminiert werden. Zur Herstellung eines sicheren, doppelt attenuierten Vakzinestamms sollte die neu etablierte Methode anschließend mit der Deletion eines essentiellen Gens kombiniert werden. Hierfür sollte das P. berghei pdh- $e1\alpha$ Gen (PBANKA_092380) verwendet werden, da für die pdh-e1α Gendeletion in P. yoelii bereits eine späte Attenuierung der Parasiten in der Leberphase gezeigt wurde. Für die Charakterisierung des Phänotyps der *pdh-e1* Gendeletion in *P. berghei* sollten auch einfach attenuierte pdh-e 1α Gen knockout Parasiten hergestellt werden. Von allen transgenen Parasiten sollten klonale Parasitenlinien hergestellt und in vitro und in vivo hinsichtlich ihrer Entwicklung in der Leberphase bzw. hinsichtlich der Entwicklung einer Blutinfektion analysiert werden. Abschließend sollte in ersten Immunisierungsexperimenten überprüft werden, ob die Immunisierung mit den hergestellten attenuierten Parasiten Mäuse gegen eine Infektion mit Wildtypsporozoiten schützen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: Geräte

Gerät	Spezifikation	Hersteller- / Vertriebsfirma		
Analysenwaage	KERN 410	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D		
Agarose- Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue [™]	PEQLAB, Erlangen, D		
Binokular	KL1500LCD	Zeiss, Hamburg, D		
Prutophropk	B5060EK-C02			
Brutschrank	B6200	Heraeus, Hannover, D		
Digitalkamera	C4742-95	Hamamatsu, Herrsching, D		
Durchflusspumpe	Pharmacia LKB-Pump P1	Pharmacia, Karlsruhe, D		
Fluoreszenz-Binokular	SMZ 800	Nikon, Düsseldorf, D		
Fluoreszenzmikroskop (aufrecht, Weitfeld)	Leitz DM RB	Leica, Bentheim, D		
Fluoreszenzmikroskop (invers, Weitfeld)	Axiovert 200	Zeiss, Hamburg, D		
Fluoreszenzmikroskop (konfokal, Punktscanner)	FluoView 1000	Olympus, Hamburg, D		
Fluoreszenzmikroskop (konfokal, Linienscanner)	LSM5 Live	Zeiss, Jena, D		
Inverses Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Hamburg, D		
Fortsetzung nächste Seite				

Gerät	Spezifikation	Hersteller- / Vertriebsfirma		
Laborinkubator (Mückenkultur)	Climacell-707	MMM-Group, Gräfelfing, D		
Magnetrührer	RET basic	IKA Labortechnik, Hamburg, D		
Mikrowelle	R-208	Sharp Electronics, Hamburg, D		
pH-Meter	pH Level 1	InoLab, Weilheim, D		
	Pipetman [®] P2			
	Pipetman [®] P10			
Pipetten	Pipetman [®] P20	Gilson International, Limburg-Offheim, D		
	Pipetman [®] P200			
	Pipetman [®] P1000			
Pipettierhilfe	Pipetus [®] -akku	Hirschmann, Eberstadt, D		
Photometer	NanoDrop [™] 2000	Thermo Scientific, Wilmington, U.S.A.		
Power-Supply	EPS 3500	Amersham Biosciences, Freiburg, D		
Power-Supply	Power PAC 300	Bio-Rad, München, D		
Präzisionswaage	TP-3002	Denver Instrument, Göttingen, D		
Schüttler	Innova [™] Inkubator Shaker 4400	New Brunswick Scientific, Nürtingen, D		
Ctovilla and	BSB 6A	Gelaire Flow Laboratories, Opera, I		
Sterilbank	Herasafe	Heraeus Instruments, Osterode, D		
Thermoblock	Thermoblock Thermomixer 5436			
Fortsetzung nächste Seite				

Gerät	Spezifikation	Hersteller- / Vertriebsfirma
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Rodgau- Jüdesheim, D
,	MJ Mini [™]	Bio-Rad, München, D
Transfektionsapparat	Nucleofector II	Amaxa Biosystems, Köln, D
UV-Transilluminator	UV-Flächenstrahler	Konrad Bender, Wiesloch, D
Vortexer	VF2	IKA, Labortechnik, Hamburg, D
Wasserbad	FBH 604	Fisherbrand [®] , Schwerte, D
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld, Lauda- Königshofen, D
	5415C	Eppendorf, Hamburg, D
	5417	Eppendon, Hamburg, D
	4K10	Circumo Stainhaina D
Zentrifugen	1-15K	Sigma, Steinheim, D
	Minifuge T	Heraeus, Hannover, D
	J2-H5	Bookmann Krofold D
	J2-21	Beckmann, Krefeld, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Vertriebsfirma		
Chirurgische Schere, 13 cm	Hauptner, Zürich, CH		
Fortsetzung nächste Seite			

Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Vertriebsfirma		
CryoTubes™	Nunc, Roskilde, DK		
Deckgläschen, rund, Ø 13 cm	Menzel & Glaser, Braunschweig, D		
Dumont Präzisionspinzette, 5/45°	Roth, Karlsruhe, D		
Einwegkanülen	Braun, Melsungen, D		
Einwegspritzen	Braun, Melsungen, D		
Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf, D		
Glasbodenschalen	WillCo Wells, Amsterdam, NL		
Glasobjektträger (Super Frost™)	Roth, Karlsruhe, D		
Insulinspritzen (BD-Micro-Fine 0,5 ml)	BD Medical, Heidelberg, D		
Kunststoffpipetten (5 ml / 10 ml / 25 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf, D		
Parafilm	Pechiney, Mühltal, D		
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, D		
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym, Oldendorf, D		
Petrischalen	Nunc, Roskilde, DK		
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf, D		
Pipettenspitzen gestopft	Greiner, Solingen-Wald, D		
Reaktionsgefäße (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D		
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D		
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nürnbrecht-Rommeldorf, D		
Zellkulturflaschen (25 m² und 75 m²)	Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf, D		
Zellkulturschalen (24 <i>well</i>)	Greiner, Solingen-Wald, D		

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2.3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller / Vertriebsfirma		
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A		
Agarose	Bio&Sell, Nürnberg, D		
Alsever's Solution	Sigma, Steinheim, D		
Amaxa [®] Human T Cell Nucleofector [®] Kit	Lonza, Köln, D		
Amphotericin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A		
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D		
Aqua ad iniectabilia Delta Select	Delta Select GmbH, Pfullingen, D		
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt, D		
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D		
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako, Cambridgeshire, UK		
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim, D		
Desoxyribonukleinsäuretriphosphat (dNTP) Mix	Roth, Karlsruhe, D		
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D		
Domitor [®]	Pfitzer GmbH, Karlsruhe, D		
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Natriumsalz	Biomol, Hamburg, D		
Ethanol (100 %)	Roth, Karlsruhe, D		
Ethidiumbromid (1 %)	Biomol, Hamburg, D		
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A		
Gentamicin-ratiopharm®80 SF Ratiopharm GmbH, Ulm,			
Fortsetzung nächste Seite			

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller / Vertriebsfirma	
Glukose	Roth, Karlsruhe, D	
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D	
Hefe-Extrakt	Biomol, Hamburg, D	
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm GmbH, Ulm, D	
Hoechst 33342 (BisBenzimidin H33342 trihydrochlorid)	Molecular Probes, Leiden, NL	
Hyperladder DNA Marker	Bioline, Luckenwalde, D	
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D	
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D	
Ketavet [®] (100 mg/ml)	Pfitzer GmbH, Karlsruhe, D	
L-Glutamin (100 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A	
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe, D	
LB-Medium (Lennox)	Roth, Karlsruhe, D	
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, D	
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe, D	
MEM with Earle's salts without L- glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A	
Methanol	Roth, Karlsruhe, D	
MitoTracker [®] CMXRos	Molecular Probes, Leiden, NL	
MitoTracker [®] Green FM	Molecular Probes, Leiden, NL	
Natriumacetat	Biomol, Hamburg, D	
Natriumchlorid Roth, Karlsruhe, D		
Fortsetzung nächste Seite		

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller / Vertriebsfirma		
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D		
Nycodenz	AXIS-SHIELD Poc AS, Oslo, N		
Paraformaldehyd	Fluka, Steinheim, D		
Penicillin/Streptomycin-Mix (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A		
Pyrimethamin	Sigma, Steinheim, D		
Rompun (Xylazin, 2 %)	Bayer, Leverkusen, D		
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A		
Saccharose	Sigma, Steinheim, D		
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, D		
Tris	Biomol, Hamburg, D		
Tris-HCI	Biomol, Hamburg, D		
Trypanblau	Merck, Darmstadt, D		
Trypton	Biomol, Hamburg, D		
Wright's stain	Sigma, Steinheim, D		
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D		

2.1.4 Enzyme

Tab. 2.4: Enzyme

Enzym	Hersteller / Vertriebsfirma		
Calf intestinal phosphatase (CIP; Alkalische Phosphatase)	New England Biolabs, Frankfurt, D		
Phusion™ High Fidelity DNA- Polymerase	Finnzymes/New England Biolabs, Frankfurt am Main, D		
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt, D		
Taq DNA-Polymerase (GoTaq)	Promega, Mannheim, D		
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D		
Ribonuklease A	Sigma, Steinheim, D		

2.1.5 Kits

Tab. 2.5: Kits

Kit	Hersteller / Vertriebsfirma	Verwendungszweck
Human T Cell Nucleofector™ Kit	Lonza, Köln, D	Transfektion von <i>P. berghei</i> Parasiten
InstaGene [™] Matrix	Bio-Rad, München, D	Isolierung von Clostridium perfringens DNA
Maxima [™] First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, D	Reverse Transkription von RNA in cDNA
NucleoBond® PC 100	Macherey&Nagel, Düren, D	Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>
NucleoSpin [®] Blood QuickPure	Macherey&Nagel, Düren, D	Isolierung genomischer DNA aus <i>P. berghei</i> Blutstadien
NucleoSpin [®] Extract II	Macherey&Nagel, Düren, D	Aufreinigung von DNA aus Agaroseblöckchen, aus PCR-Reaktionen und nach Restriktion
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey&Nagel, Düren, D	Isolierung von Plasmid- DNA aus <i>E. coli</i>
NucleoSpin [®] RNA II	Macherey&Nagel, Düren, D	Isolierung von Gesamt- RNA

2.1.6 Häufig verwendete Lösungen/Medien

Tab. 2.6: Häufig verwendete Lösungen/Medien

Lösung/Medium	Zusammensetzung		
Ampicillin Stocklösung	100 mg/ml in dH ₂ O		
Anästhetikum für Mäuse	40 μl Rompun, 80 μl Ketavet, 120 μl PBS pH 7,4, Injektion: 80 μl pro 22 g Körpergewicht		
Blockierlösung für Immunfluoreszenzanalyse	10 % (v/v) FCS in PBS (pH 7,4)		
DNA-Ladepuffer (6x)	60 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau Natriumsalz, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF		
Einfriermedium für Blutstabilate	10 % (v/v) Glycerin in Alsever's Solution		
Gepuffertes Medium für Nycodenz- Lösung	3 mM KCl, 0,3 mM CaNa ₂ EDTA, 5 mM Tris-HCl: einstellen auf pH 7,5		
Kulturmedium für HepG2-Zellen	500 ml Minimal Essential Medium with Earle's salts (MEM), 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin		
Infektionsmedium für HepG2-Zellen	1 % Amphotericin in Kulturmedium für HepG2-Zellen		
LB-Medium	20 g/l LB-Broth in dH ₂ O: autoklavieren		
Nycodenzstocklösung	500 ml gepuffertes Medium (s.o.), 138 g Nycodenz		
Paraformaldeyd-Lösung (4 %)	100 ml PBS, 4 g Paraformaldehyd, pH 7,4		
PBS (10x)	750 mM NaCl, 57 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ : einstellen auf pH 7,4		
Pyrimethamin-Stocklösung (100x)	7 mg/ml Pyrimethamin in DMSO		
Saponin-Lösung (10x)	1,5 % (w/v) Saponin in PBS pH 7,4		
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl: autoklavieren; 2,5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 5 mM MgSO ₄ , 0,4 % Glukose: steril filtrieren		
TAE-Puffer	0,4 M Tris, 0,2 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA-Na ₂ : einstellen auf pH 8,0		
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA: einstellen auf pH 8,0		
TE-RNase A-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20 μg/ml RNase A		
Transfektionsmedium	100 ml RPMl 1640, 25 ml FCS, 50 μl Gentamicin-Ratiopharm [®] 80SF		

2.1.7 Oligonukleotide

Tab. 2.7: Oligonukleotide

Nr.	Sequenz (5'→3')	Enzym	[°C]	Verwendung
#602	CG <u>GGATCC</u> ATGTGTAAAAAAGTAAAATGATTATAATAGAAGTG	BamHI	65,7	Amplifikation der Pb103464.00.0- Region, rev
#616	GCATCACCTTCACCCTCTCC		64,5	Sequenzierprimer, bindet im <i>gfp-orf</i> , rev
#1161	CG <u>GATATC</u> GTTGCATTATCGTCAAAAGTG	EcoRV	64,6	Amplifikation der Pb103464.00.0- Region, fwd
#1195	GATCC <u>GCGGCCGC</u> CCTAGGAGGTAAGCCTATCCCTAACC CTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGTAGT	Notl	88,6	V5-Epitop- Oligonukleotid, sense
#1208	GC <u>GGATCC</u> ATGATAAGATTTAAGAAAACAAAAT	<i>Bam</i> HI	62,2	Amplifikation des pfo-orf, fwd
#1209	GC <u>GCGGCCGC</u> ATTGTAAGTAATACTAGATCCAGG	Notl	71,9	Amplifikation des pfo-orf, rev
#1225	CTAGACTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGG ATAGGCTTACCTCCTAGG <u>GCGGCCGC</u> G	Notl	88,6	V5-Epitop- Oligonukleotid, antisense
#1244	TCTACGTAGTCTAGAAGATCCCGT		62,9	Integrations-PCR
#1344	TGGAGCAGGAAATAACTGGG		60	Tubulin-Kontrolle für RT-PCR, fwd
#1345	ACCTGACATAGCGGCTGAAA		60	Tubulin-Kontrolle für RT-PCR, rev
#1351	GGAGATGGCTGTCTAGCGGAAATACAG		66,5	Integrations-PCR
#1360	CTATAATTTAAGTAAGCAAAGTGAAG		55,3	Integrations-PCR
#1361	CTTCTGTTTTAGGTGATAATATATTAC		55,9	Integrations-PCR
#1380	CGTAGAATTCAACGTTTCTAGC		56,5	Integrations-PCR
#1381	GAATAGTGACTTTCAGTGAAATCG		57,6	Integrations-PCR
#1459	GC <u>ATCGAT</u> AGCTTAATTCTTTTCGAGCTCTTT	Clal	64,4	Amplifikation des pbeef1 α a, fwd
#1460	GC <u>AAGCTT</u> CGAAATTGAAGGAAAAAACATCATTTG	<i>Hin</i> dIII	64,8	Amplifikation des 3'dhfr/ts, rev
#1593	GC <u>GGTACC</u> TTGCCATAGTCCTCTTTGACC	Kpnl		Amplifikation der 5'UTR-Region von PBANKA_092380 pdh-e1α, fwd
#1594	GC <u>ATCGAT</u> TGTTTGTCACCTCAATTAAGAA	Clal		Amplifikation der 5'UTR-Region von PBANKA_092380 pdh-e1α, rev
#1595	GC <u>GCGGCCGC</u> ATAGAAGCTATTACATACAGAAC	Notl		Amplifikation der 3'UTR-Region von PBANKA_092380 <i>pdh-e1α</i> , fwd
Fortsetzung nächste Seite				

Nr.	Sequenz (5'→3')	Enzym	T _m	Verwendung
#1596	GC <u>CCGCGG</u> AAGAAATTTTTAATATTATTATGG	SaclI		Amplifikation der 3'UTR-Region von PBANKA_092380 pdh-e1α, rev
#1611	AAAGAGCTCGAAAAGAATTAAGCT		55,9	Sequenzierprimer, bindet in <i>pbeef1α</i> - Promotor, rev
#1633	CG <u>GAATTC</u> GTTGCATTATCGTCAAAAGTG	<i>Eco</i> RI	64,6	Amplifikation der Pb103464.00.0- Region, fwd
#1634	GC <u>GAATTC</u> CGAAATTGAAGGAAAAAACATCATTTG	<i>Eco</i> RI	64,7	Amplifikation des 3'dhfr/ts, rev
#1938	AGGAGGAGATGCACAAGAACA		57,9	RT-PCR, pfo, fwd
#1939	CATTCCCAAGCAAGACCTGT		57,3	RT-PCR, pfo, rev
#1972	TTAGGGGATGGAACAAGTAA		53,2	RT-PCR, <i>pdh-</i> $e1\alpha$, fwd
#1973	TTTGAATCTGCATCATTTTG		49,1	RT-PCR, <i>pdh-</i> $e1\alpha$, rev

2.1.8 Primärantikörper

Tab. 2.8: Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Vertriebsfirma
anti-GFP	Kaninchen	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe, D
anti-Expl	Huhn	1:1000	AG Heussler, BNI, Hamburg, D
anti-V5 IgG _{2a}	Maus	1:200	Invitrogen, Karlsruhe, D
anti-Mspl (<i>P. yoelii</i>)	Maus	1:1000	Anthony Holder, MRC National Institute for Medical Research, London, UK
anti-SERA2 093M	Ratte	1:1000	AG Heussler, BNI, Hamburg, D
anti-PbICP-c	Ratte	1:500	AG Heussler, BNI, Hamburg, D

2.1.9 Sekundärantikörper

Tab. 2.9: Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Vertriebsfirma
anti-Maus Cy5	Esel	1:200	Dianova, Hamburg, D
anti-Huhn Alexa Fluor [®] 594	Ziege	1:5000	Molecular Probes, Leiden, NL
anti-Huhn Cy5	Esel	1:4000	Dianova, Hamburg, D
anti-Kaninchen Cy2	Esel	1:250	Dianova, Hamburg, D
anti-Ratte Alexa Fluor [®] 594	Ziege	1:5000	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.10 Programme und Datenbanken

Tab. 2.10: Programme und Datenbanken

Datenbank/Programm	Verwendung
PlasmoDB	Plasmodium-Datenbank (www.plasmodb.org)
GeneDB	Plasmodium-Datenbank (www.genedb.org)
MacVector [™] 7.2.3	DNA-Sequenzvergleiche; Erstellung von Plasmidkarten
Primer3	Erstellung von Oligonukleotid- <i>primern</i> (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/)
Olympus FluoView FV10-ASW Vers. 03.00.01.15	Aufnahme von konfokalen Bilder
Zeiss Efficient Navigation (ZEN) 2009	Aufnahme von konfokalen Zeitserien
Openlab 5.0.2	Aufnahme von Fluoreszenzbildern; Messung der Parasitengröße mit dem Modul density slicing
Adobe Photoshop CS	Erstellung von Überlagerungsbildern
ImageJ	Bearbeitung von konfokalen Bildern (Zeitfolge)
GraphPad Prism	Erstellung von Diagrammen; Statistische
Microsoft® Excel 2004	Berechnungen (Student's T-Test)
Microsoft® PowerPoint 2003	Erstellung von Abbildungen; Einstellung von Kontrast/Helligkeit bei Fluoreszenz-/Gelbildern

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von DNA aus Clostrium perfringens Bakterien

Für die PCR des offenen Leserahmens von *pfo* wurde *C. perfringens* DNA als *template* benötigt. Die *C. perfringens* Bakterien wurden freundlicherweise von Dr. H. Rohde (UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe des InstaGeneTM Matrix Kits wurde die DNA anhand der Herstellerangaben aus einer ca. 1 mm großen *C. perfringens* Kolonie isoliert. Für die anschließende PCR wurden 2,5 µl des Überstands in einem 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

2.2.2 Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus erythrozytären *P. berghei* Stadien

Für die Isolierung von *P. berghei* gDNA wurden Parasitensedimente aus erythrozytären *P. bergei* Stadien (siehe 2.3.1.4) eingesetzt. Das Parasitensediment wurde zunächst in 200 µl PBS (pH 7,4) resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde die gDNA im Anschluss mit Hilfe des NucleoSpin[®] Blood QuickPure-Kits nach Herstellerangaben isoliert. Die gDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 ℃ gelagert.

2.2.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus P. berghei Leberstadien

Mit *P. berghei* infizierte HepG2-Zellen (siehe 2.4.3) wurden zum ausgewählten Zeitpunkt nach Infektion mit PBS gewaschen und anschließend in 350 μl Lysepuffer des NucleoSpin[®] RNA II Kits aufgenommen. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte im Anschluss entsprechend der Herstellerangaben. Teilweise wurden die Proben zunächst im Lysispuffer bei -20 °C gelagert und erst später der RNA-Isolierung unterzogen.

Die isolierte RNA wurde anschließend sofort für eine cDNA-Synthese eingesetzt, oder bei -70 ℃ gelagert.

2.2.4 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Die isolierte RNA (siehe 2.2.3) wurde mit Hilfe des MaximaTM First Strand cDNA Synthesis Kits in cDNA transkribiert. Hierfür wurden 1 μg RNA folgendermaßen eingesetzt:

Tab. 2.11: Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese

Reagenz	+RT	-RT
5x Reaction Mix	4 µl	4 µl
Maxima® Enzyme Mix	2 µl	-
Template RNA (1 μg)	ΧμΙ	Χμl
H₂O (Nuklease-frei)	ad 20 µl	ad 20 µl

Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Tab. 2.12: Temperaturprogramm für cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit
25 ℃	10 min
50 ℃	15 min
85 ℃	5 min

Für anschließende PCR-Analysen wurde jeweils 1 µl der Reaktionsansätze als template eingesetzt. Die Reaktionsansätze ohne Reverse Transkriptase (-RT) dienten zur Kontrolle, ob die eingesetzte RNA gDNA-Kontaminationen enthielt.

2.2.5 Photometrische Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen

Die Konzentration von DNA- bzw. RNA-Lösungen wurde über die optische Dichte (OD) mit Hilfe eines NanoDrop™ Spektralphotometers ermittelt. Für die Messung wurde 1 µl Nukleinsäurelösung auf die Messeinheit pipettiert. Die Messung der OD erfolgte bei

einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Ein OD_{260} -Wert von 1 entspricht dabei ungefähr einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml bzw. einer RNA-Konzentration von ungefähr 40 μ g/ml. Aus dem $OD_{260/280}$ -Wert ließen sich Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäurelösungen ziehen. Eine DNA-Lösung ohne Proteinverunreinigungen weist einen $OD_{260/280}$ -Wert von 1,8 auf. Für RNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 2,0.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für analytische Zwecke wurde die GoTaq® DNA-Polymerase eingesetzt. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase verwendet. Die benötigten Oligonukleotide (siehe 2.1.7) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen. Nach Möglichkeit wurden die Sequenzen der Oligonukleotide so ausgewählt, dass die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide bei etwa 55 ℃ bis 60 ℃ lagen. Die Schmelztemperaturen wurden mit den Programmen MacVector™ bzw. Primer3 berechnet. Die Oligonukleotide wurden in lyophilisertem Zustand geliefert. Durch Zugabe von DNase-freiem, destilliertem Wasser (dH₂O, aqua ad iniectabilia Delta Select) wurden die Oligonukleotide gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt (Stocklösung). Aus einem Aliquot der Stocklösung wurde eine 10fach verdünnte Arbeitslösung hergestellt (10 pmol/µl). Die Lagerung der Oligonukleotidlösungen erfolgte bei -20 ℃. Als *template*-DNA wurde gDNA, cDNA oder Plasmid-DNA (siehe 2.2.1, 2.2.2, 2.2.4 und 2.2.16) eingesetzt.

Tab. 2.13: PCR-Reaktionsansatz für GoTag® DNA-Polymerase

Reagenz	Volumen
5 x Green GoTaq [®] Reactionbuffer	5 μΙ
dNTP-Mix (10 mM von jedem der vier dNTPs)	0,5 μΙ
Sense-Oligonukleotid-Primer (10 pmol/μΙ)	1,25 µl
Antisense-Oligonukleotid-Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
Template DNA (ca. 50 – 200 ng/μl)	1 μΙ
GoTaq [®] DNA Polymerase (5U/μΙ)	0,13 μΙ
dH₂O (aqua ad iniectabilia Delta Select)	ad 25 μl

Tab. 2.14: PCR-Reaktionsansatz für Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase

Reagenz	Volumen
5 x Phusion HF Reactionbuffer	10 μl
dNTP-Mix (10 mM von jedem der vier dNTPs)	1 μΙ
Sense-Oligonukleotid-Primer (10 pmol/μl)	2,5 μΙ
Antisense-Oligonukleotid-Primer (10 pmol/µl)	2,5 μΙ
Template DNA (ca. 10 – 200 ng/μl)	1 μΙ
Phusion [®] High-Fidelyty DNA Polymerase (2 U/µI)	0,5 μΙ
dH₂O (aqua ad iniectabilia Delta Select)	ad 50 µl

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCRs wurden im Allgemeinen die in Tab. 2.15 exemplarisch angegebenen Temperaturprogramme verwendet. Je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide und der Länge des zu erwartenden PCR-Produkts wurden die Temperaturprogramme entsprechend verändert und angepasst.

Tab. 2.15: PCR-Reaktionsansatz für die GoTaq® und die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase

	GoTaq [®] DNA-Polymerase			Phusion [®] D	NA-Polyn	nerase
	Temperatur	Zeit	Zyklen	Temperatur Zeit Zy		Zyklen
Initiale DNA- Denaturierung	95 ℃	2 min	1x	98 ℃	30 s	1x
Denaturierung	95 ℃	30 s		98 ℃	30 s	
Annealing	55 ℃	1 min	30x	55 ℃	30 s	27x
Elongation	68 ℃	2 min		68 ℃	30 s	
Finale Elongation	68 ℃	10 min	1x	68 ℃	10 min	1x
Abkühlen/Halten der Temperatur	4 ℃	∞		4℃	8	

2.2.7 Herstellung von V5-dsDNA-Oligonukleotiden

Zur Herstellung von V5-dsDNA-Oligonukleotiden wurden jeweils 10 μ l der ssDNA-Oligonukleotide #1195 und #1225 (10 μ M, gelöst in dH₂O, aqua ad iniectabilia Delta Select) (siehe 2.1.7) zusammen in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und dabei gemischt. Das Reaktionsgefäß mit dem Oligonukleotidgemisch wurde anschließend in einem Thermocycler mit folgendem Temperatur-Programm inkubiert:

Tab. 2.16: Temperaturprogramm für das Oligonukleotid-annealing

Temperatur	Zeit
95 ℃	10 min
75 ℃	10 min
55 ℃	10 min
35 ℃	10 min
25 ℃	10 min

Das langsame Abkühlen erlaubt das Anlagern (*annealing*) von revers-komplementären Abschnitten zu doppelsträngigen Oligonukleotiden.

Die hergestellten dsDNA-Oligonukleotide wurden im Anschluss für die Klonierung in den pL0017.1.1-Vektor verwendet (siehe 2.2.16.2). Für die Ligation in den Vektor wurden 3 µl in einem 10 µl Ligationsansatz (siehe 2.2.11) eingesetzt.

2.2.8 Restriktion von DNA

Die zu verdauende DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (siehe 2.1.4), dem vom Hersteller empfohlenen 10fach Reaktionspuffer sowie, abhängig vom Restriktionsenzym, mit BSA versetzt und anschließend für 1 h im Thermoblock bei 37 ℃ inkubiert. Für eine analytische Restriktion wurden 2 bis 3 μl DNA-Lösung (ca. 200 bis 500 ng) aus einer Plasmid-DNA Minipräparation (siehe 2.2.13) eingesetzt.

Für eine präparative Restriktion von PCR-Produkten und Plasmid-DNA wurden ca. 1 bis 2 µg DNA eingesetzt.

Tab. 2.17: Zusammensetzung von Restriktionsansätzen

Reagenz	Analytische Restriktion	Präparative Restriktion
DNA	200 – 500 ng	1 – 2 μg
10fach Reaktionspuffer	2 μΙ	5 µl
100fach BSA (10 mg/ml)	0,2 μΙ	0,5 μΙ
Restriktionsenzym (10 - 20 Units/µI)	0,5 μΙ	1 µl
dH₂O	ad 20 µl	ad 50 μl

Nach einem präparativen Verdau von Plasmid-DNA mit nur einem Restriktionsenzym wurde die DNA mit alkalischer Phosphatase (*calf intestinal*, CIP; siehe 2.1.4) inkubiert, um die 5'-Enden der linearisierten DNA zu dephosphorylieren und somit eine spätere Religation zu verhindern. Erfolgte der vorangegangene Verdau in Reaktionspuffer NEB2, 3 oder 4 konnte die CIP direkt zu dem Reaktionsansatz pipettiert werden. Anderenfalls musste die linearisierte DNA zunächst mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt werden.

Tab. 2.18: Reaktionsansatz für CIP-Behandlung

Reagenz	Menge
Linearisierte DNA	1 – 2 μg
10fach NEB3 Reaktionspuffer	3 µl
Alkalische Phosphatase (CIP) (0,1 Units/µI)	5 μΙ
dH ₂ O	ad 30 µl

Der Reaktionsansatz wurde im Heizblock bei 37 ℃ für 30 min inkubiert.

Nach einer präparativen Restriktion bzw. einer eventuellen CIP-Behandlung wurde die DNA im Anschluss über ein Agarosegel (siehe 2.2.9) aufgereinigt.

2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse bzw. zur Aufreinigung von DNA-Proben wurden diese in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurden überwiegend 1 %ige Agarosegele hergestellt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und anschließend mit 0,1 µl/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Aushärten der Agarose wurde das Gel in eine Laufkammer mit TAE-Laufpuffer überführt. Die DNA-Proben wurden mit einem Ladepuffer versetzt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurden 5 µl des Größenmarkers HyperLadder I (200 bis 10.000 bp) mit auf das Gel aufgetragen. Entsprechend der Gelgröße wurde für 30 bis 45 min eine Spannung von 80 bis 120 V angelegt. Die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylene Cyanol FF, die sich bei der Auftrennung wie ein 300 bp bzw. wie ein 4.000 bp DNA-Fragment verhalten, ermöglichten es, den Fortschritt der Auftrennung zu verfolgen.

Die DNA wurde im UV-Licht durch das interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht und konnte somit fotografiert werden. Für Klonierungen wurden die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell als Agaroseblöckchen aus dem Gel geschnitten. Die DNA wurde im Anschluss aus der Agarose-Matrix extrahiert (siehe 2.2.10).

2.2.10 Aufreinigung von DNA

PCR-Produkte und DNA aus Agaroseblöckchen (siehe 2.2.9) wurden mit dem NukleoSpin[®] Extract II Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration photometrisch ermittelt (siehe 2.2.5). Zur Überprüfung der Reinheit der eluierten DNA wurde ein Aliquot der Probe mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.11 DNA-Ligation

Die Ligation geschnittener DNA-Fragmente (*insert*) mit linearisierter Vektor-DNA (siehe 2.2.8) erfolgte in einem 10 µl Reaktionsansatz. Vektor- und *insert*-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 zusammengegeben. Es wurden zwischen 80 bis 100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die benötigte Menge *insert*-DNA wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{ng(Vektor) \cdot kb(insert)}{kb(Vektor)} \cdot Verhältnis\left(\frac{insert}{Vektor}\right) = ng(insert)$$

Die Ligationsansätze wurden entweder für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 ℃ inkubiert.

Tab. 2.19: Reaktionsansatz für eine Ligation

Reagenz	Volumen
Vektor-DNA	y µl
insert-DNA	x µl
10fach T4-Ligase-Puffer	1 µl
T4-DNA-Ligase (400 U/μl)	1 μΙ
dH₂O	ad 10 µl

Im Anschluss erfolgte eine Transformation der ligierten DNA in kompetente *E. coli* Bakterien (siehe 2.2.12).

2.2.12 Transformation von DNA in *E. coli*

Zur Transformation zirkulärer DNA in *E. coli* Zellen wurden kompetente XL1 *blue* Bakterien verwendet. 5 μ l eines Ligationsansatzes wurden mit 50 μ l auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 $\mathbb C$. Nach einer zwei minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 950 μ l vorgewärmten SOC-Medium versetzt. Diese Mischung wurde für 1 h bei 37 $\mathbb C$ schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen sedimentiert (800 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von $100-150~\mu$ l entfernt. In diesem Restvolumen wurden die Zellen resuspendiert und die Suspension auf LB-Agar-Selektionsplatten (mit 100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte im Brutschrank über Nacht bei 37 $\mathbb C$.

2.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Minipräparation)

<u>Lösung 1</u> 50 mM Glucose

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl, pH 8,0

Lösung 2 0,2 M NaOH

1 % SDS

<u>Lösung 3</u> 3 M Kaliumacetat

2 M Essigsäure

Zur Analyse von Transformanden (siehe 2.2.12) wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen isoliert. Dazu wurden jeweils 3 ml LB-Selektionsmedium (mit Ampicillin, Endkonzentration 100 µg/ml) mit Einzelkolonien beimpft und bei 37 ℃ über Nacht schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (11.000 x g, 30 s, RT) und in 100 µl Lösung 1 vollständig resuspendiert. Darauf folgte die Zelllyse durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 und einer dreiminütigen Inkubation bei RT. Durch die Zugabe von 150 µl Lösung 3 und einer kurzen Inkubation auf Eis wurden Proteine, Zelltrümmer inklusive genomischer DNA und SDS gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (11.000 x g, 10 min, 4 °C) konnte der klare Überstand in ein neues Reakt ionsgefäß pipettiert werden. Die Plasmid-DNA wurde durch Vermischen mit 1 ml 96 %igem Ethanol gefällt.

Nach fünfminütiger Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation (16.000 x g, 10 min, RT) wurde das Präzipitat mit 70 %igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 25 µl TE-RNase A-Puffer (pH 8,0) bei 37 ℃ f ür 30 min gelöst.

Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktionsverdau (siehe 2.2.8) und Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.9). Die Plasmid-DNA wurde bei -20 ℃ gelagert.

Von ausgewählten Klonen wurde anschließend eine Plasmid-DNA Präparation mit dem NucleoSpin[®] Plasmid Kit (siehe 2.1.5) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, um Plasmid-DNA zur Sequenzierung (siehe 2.2.15) in hoher Qualität herzustellen.

2.2.14 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem NucleoBond[®] PC 100 Kit (Midipräparation)

Für die Herstellung größerer Plasmid-DNA Mengen wurden 100 ml LB-Selektionsmedium (mit Ampicillin, Endkonzentration 100 μ g/ml) mit Bakterien eines zuvor positiv getesteten Klons (siehe 2.2.13) beimpft und bei 37 °C über Nacht schüttelnd inkubiert. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA mit dem NucleoBond® PC 100 Kit erfolgte anhand des Herstellerprotokolls. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in dH₂O (aqua ad iniectabilia Delta Select) gelöst und auf eine Konzentration von ca. 1 μ g/ μ l eingestellt. Die DNA-Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Proben wurde von der Firma Seqlab (Göttingen, D) durchgeführt.

2.2.16 Verwendete und klonierte *P. berghei* Expressionskonstrukte

2.2.16.1 pOB90-37-36-Vektor

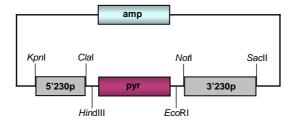


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des pOB90-37-36-Vektors

Die Abkürzungen werden im Text erläutert. Zusätzlich sind die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme eingezeichnet.

Die Plasmid-DNA des pOB90-37-36-Vektors wurde freundlicherweise von Dr. R.R. Stanway (BNI, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält eine Ampicillin-Resistenzkassette (amp), die für die Selektion von *E. coli* Bakterien benötigt wird. Weiterhin bindet sich im Vektor eine Kassette zur Expression der *Toxoplasma gondii* Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthetase (Tg*dhfr/ts*) (pyr). Diese vermittelt eine

Resistenz gegen den Selektionsmarker Pyrimethamin und ermöglicht somit eine Selektion transgener Parasiten. Der offene Leserahmen (engl.: open reading frame: orf) der Tgdhfr/ts wird in dieser Kassette von den DNA-Abschnitten der 5' und 3' untranslatierten Region (UTR) des *P. berghei dhfr/ts* Gens flankiert.

Zur stabilen Integration in das *P. berghei* Genom enthält der pOB90-37-36-Vektor einen 0,7 kb großen DNA-Abschnitt der 5' Region sowie einen 1 kb großen DNA-Abschnitt der 3' Region aus dem *orf* des *P. berghei* p230p-Lokus (**5'230p**; **3'230p**). Die Integration in den p230p-Lokus erfolgt über Doppel *cross-over* (Janse et al., 2006a).

2.2.16.2 pL0017.1.4-Vektor

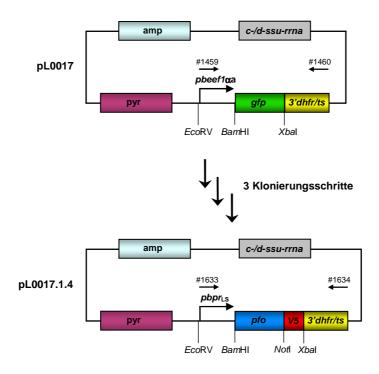


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Klonierung des pL0017.1.4-Vektors

In einer dreistufigen Klonierung wurde der pL0017.1.4-Vektor ausgehend vom pL0017-Vektor hergestellt (siehe Text). Die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. 3'dhfr/ts: 3'-UTR der P. berghei Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthetase (weitere Abkürzungen siehe Text).

Durch PCR der pL0017-DNA mit den Oligonukleotid-*primern* #1459 und #1460 konnte die vollständige GFP-Expressionskassette amplifiziert werden. Eine PCR der pL0017.1.4-DNA mit den Oligonukleotid-*primern* #1633 und #1634 ermöglichte die Amplifizierung der vollständigen PFO::V5-Expressionskassette.

Der pL0017.1.4-Vektor wurde basierend auf dem pL0017-Vektor (MRA-786; MR4 Malaria Research and Reference Reagent Resource Center) kloniert. Neben einer Ampicillin- (amp) und einer Pyrimethaminresistenz-Kassette (pyr) enthalten beide Vektoren einen DNA-Abschnitt zur Integration in den *P. berghei c-* bzw. *d-ssu-rRNA*-Lokus (c-/d-ssu-rrna) mittels *single cross-over*. Die Klonierung des pL0017.1.4-Vektors wird im Folgenden beschrieben:

Im ersten Schritt wurde die Sequenz des konstitutiv aktiven $eef1\alpha a$ -Promotors ($pbeef1\alpha a$) im pL0017-Vektor gegen die Sequenz einer leberphasenspezifischen Promotorregion ($pbpr_{LS}$) ausgetauscht. Hierzu wurde die DNA der Promotorregion des Pb103464.00.0-Gens (Helm et al., 2010) unter Verwendung der Oligonukleotid-primer #1161 und #602 aus P. berghei gDNA amplifiziert und anschließend über die EcoRV-und BamHI-Restriktionsschnittstellen in den pL0017-Vektor kloniert (resultierender Vektor: pL0017.1.1).

Im zweiten Schritt wurde die für das V5-Epitop (**V5**) kodierende dsOligonukleotid-DNA (siehe 2.2.7) in den pL0017.1.1-Vektor kloniert. Beim V5-Epitop handelt es sich um ein kurzes Peptid aus 14 Aminosäuren (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr). Ursprünglich stammt die Sequenz des V5-Epitops aus den P und V Proteinen des Simian Virus5 (SV5) (Southern et al., 1991). Proteine, die mit dem V5-Epitop kombiniert als Fusionsprotein exprimiert werden, können mit Hilfe kommerziell erhältlicher Anti-V5-Antikörper analysiert werden.

Die V5-dsOligonukleotid-DNA wurde durch annealing von revers-komplementärer ssOligonukleotid-DNA hergestellt (siehe 2.2.7). Die entstandenen dsDNA-Olignonukleotide hatten nach dem annealing an beiden Enden einzelsträngige Überhänge, über die sie in den mit BamHI und Xbal verdauten pL0017.1.1-Vektor kloniert wurden (resultierender Vektor: pL0017.1.2). Durch die Restriktion des pL0017.1.1-Vektors mit BamHI und Xbal wurde die für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierende Sequenz entfernt. Über das V5-dsOligonukleotid wurde zusätzlich eine Notl-Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingefügt, die für den folgenden Klonierungsschritt benötigt wurde.

Hier erfolgte die Klonierung der kodierenden Sequenz von Perfingolysin O (**PFO**) über die *Bam*HI- und *Not*I-Restriktionsschnittstellen in den pL0017.1.2-Vektor. Der PFO *orf* wurde hierfür zuvor durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotid-*primer* #1208 und #1209 aus *Clostridium perfringens* DNA (siehe 2.2.1) amplifiziert. Um eine spätere Expression von PFO als PFO::V5-Fusionsprotein zu ermöglichen, war der *reverse* Oligonukleotid-*primer* so konstruiert worden, dass das Stopp-Codon des *pfo*-Gens nicht mitamplifiziert wurde. Der aus diesem Klonierungsschritt hervorgegangene Vektor erhielt die Bezeichnung pL0017.1.4.

Der pL0017.1.4-Vektor diente im Rahmen dieser Doktorarbeit als *template* für nachfolgende PCR-Schritte.

2.2.16.3 Klonierung des P. berghei Expressionsvektors pSI230-PFOLS

Der pSI230-PFO_{LS}-Vektor wurde ausgehend vom pOB90-37-36-Vektor (2.2.16.1) hergestellt.

Unter Verwendung der Oligonukleotid-*primer* #1459 und #1460 wurde zunächst die GFP-Expressionskassette des pL0017-Vektors (siehe 2.2.16.2) per PCR amplifiziert. Nach einer Restriktion mit *Clal*- und *Hin*dIII wurde das PCR-Produkt in den ebenfalls mit *Clal*- und *Hin*dIII verdauten pOB90-37-36-Vektor kloniert. Zur Vereinfachung erhielt der resultierende Vektor die Bezeichnung pSI230 (= "stabile Integration im *P. berghei p230p*-Lokus").

Im Anschluss erfolgte zur Herstellung des pSI230-PFO_{LS}-Vektors die Klonierung der PFO::V5-Expressionskassette über *Eco*RI in den pSI230-Vektor. Die PFO::V5-Kassette wurde zuvor unter Verwendung der Oligonukleotid-*primer* #1633 und #1634 aus pL0017.1.4-Plasmid-DNA (siehe 2.2.16.2) amplifiziert.

2.2.16.4 Klonierung des *P. berghei* Expressionsvektors pPDH-E1α-KO

Der pPDH-E1 α -KO-Vektor diente zur Genaustauschmutagenese eines Abschnitts des $P.\ berghei$ Pyruvatdehydrogenase- $e1\alpha$ (pdh- $e1\alpha$) Gens (GeneDB: PBANKA_092380) mittels homologer Rekombination. Zur Herstellung des pPDH-E1 α -KO-Vektors wurden die 5'- und 3'230p-DNA-Abschnitte des pSI230-Vektors (siehe 2.2.16.3) gegen 5'- bzw. 3'-DNA-Abschnitte des Pbpdh- $e1\alpha$ -Lokus ausgetauscht:

Durch PCR wurde ein ca. 0,8 kb DNA-Abschnitt der 5'-UTR des Pb*pdh-e1α*-Gens aus *P. berghei* gDNA amplifiziert (Oligonukleotid-*primer* #1593 und #1594). Das PCR-Produkt wurde mit *Kpn*I und *Cla*I verdaut und anschließend in den ebenfalls mit *Kpn*I und *Cla*I verdauten pSI230-Vektor kloniert (Schritt 1). Im zweiten Schritt wurde ein ca. 0,8 kb DNA-Abschnitt aus *P. berghei* gDNA amplifiziert (Oligonukleotid-*primer* #1595 und #1596), der ca. 0,4 kb vom Ende des *pbpdh-e1α*-Gens und ca. 0,4 kb der 3'-UTR umfasste. Dieses PCR-Produkt wurde über *Not*I und *Sac*II in den Vektor aus Schritt 1 kloniert (resultierender Vektor: pPDH-E1α-KO).

2.2.16.5 Klonierung des *P. berghei* Expressionsvektors pPDH-E1α-KO_PFO_{LS}

Die PFO::V5-Expressionskassette des pSI230-PFO_{LS}-Vektors (siehe 2.2.16.3) wurde durch Restriktion mit EcoRI aus dem Plasmid ausgeschnitten und anschließend in den ebenfalls mit EcoRI verdauten pPDH-E1 α -KO-Vektor (siehe 2.2.16.4) kloniert (resultierender Vektor: pPDH-E1 α -KO_PFO_{LS}).

2.3 Kultivierung von *P. berghei*

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit dem Malaria-Nagetierpathogen *P. berghei* ANKA (Vincke and Lips, 1948) durchgeführt. Die Kultivierung der Parasiten erfolgte sowohl im Säugetierwirt, der Maus, als auch im Endwirt, weiblichen Mücken der Gattung *Anopheles stephensi*. Die Erhaltung dieses Zyklus war notwendig, um leberinfektiöse Sporozoitenstadien zu erhalten, die für *in vitro* und *in vivo* Experimente benötigt wurden. Die Haltung von *Plasmodium* Leberstadien in Dauerkultur ist, im Gegensatz zu *Plasmodium* Blutstadien, nicht möglich.

2.3.1 Blutstadium

2.3.1.1 Infektion von Mäusen aus Blutstabilaten

Zur Infektion mit *P. berghei* Parasiten wurden einer Maus ca. 200 µl Blutstabilat (siehe 2.3.1.3) intraperitoneal injiziert. Hierfür wurden 6 bis 8 Wochen alte NMRI Mäuse verwendet.

2.3.1.2 Färben von Blutausstrichen

Ein Tropfen Blut wurde aus der Schwanzvene einer infizierten Maus entnommen, auf einem Objektträger ausgestrichen und getrocknet. Zur Färbung der Parasiten wurden 10 Tropfen Wright-Färbelösung (1 mg/ml Wright Stain in Methanol) auf den Blutausstrich getropft. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurden 10 Tropfen ddH₂O hinzugetropft. Nach einer Minute wurde der Objektträger vorsichtig mit Leitungswasser

abgespült und getrocknet. Anschließend konnte am Lichtmikroskop die Parasitämie (infizierte Blutzellen/nicht-infizierte Blutzellen*100) bestimmt werden. Des Weiteren war eine morphologische Untersuchung der Parasiten möglich.

2.3.1.3 Herstellung von Blutstabilaten

Bei einer Parasitämie von 5 bis 15 % wurde die Maus getötet und ihr Blut danach durch Herzpunktion entnommen. Anschließend wurden Aliquots von 100 µl Blut mit jeweils 200 µl Einfrierlösung (siehe 2.1.6) gemischt und danach sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.1.4 Saponinextraktion von erythrozytären P. berghei Parasiten

Zur Isolierung von *P. berghei* Parasiten der erythrozytären Phase wurde eine Saponinextraktion durchgeführt. Saponin zerstört die Erythozytenmembran und die Membran der parasitophoren Vakuole, lässt jedoch bei einer kurzen Inkubationszeit die Parasitenmembran intakt.

Das Blut einer infizierten NMRI-Maus (ca. 0,5 bis 1 ml Blut; Parasitämie >2 %) wurde durch Herzpunktion entnommen. Die Blutzellen wurden durch Zentrifugation (4.000 x g, 4 ℃, 3 min) sedimentiert. Nach vorsichtiger Entfer nung des Serums wurde das Zellsediment mit ca. 1 ml PBS pH 7,4 gewaschen und anschließend mit 1 ml einer 0,15 %igen Saponinlösung vorsichtig resuspendiert. Diese Suspension wurde 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 3 min (4.000 x g, 4 ℃) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Parasitensediment sollte nun als hellbraunes Pellet zu erkennen sein. Im Falle einer unvollständigen Lyse wurde die Behandlung mit Saponin noch einmal wiederholt. Im Anschluss wurde das Parasitensediment einmal mit PBS gewaschen. Nach Entfernung des Überstands wurde das Sediment bis zur weiteren Verwendung bei -20 ℃ gelagert.

2.3.2 Mückenstadium

2.3.2.1 Mückenzucht

Die Zucht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten A. stephensi Mücken erfolgte bei einer Temperatur von 27 ℃ und einer Luftfeuchtigke it von 80 % in einem 12-Stunden-Tag-und-Nacht-Zyklus. Die Ernährung der Mücken erfolgte über mit 10 %iger Glukoselösung getränkte Wattebälle, die auf die oberen Netze der Mückenkäfige gelegt wurden. Für die Eiproduktion erhielten die weiblichen Mücken zudem zweimal pro Woche eine Blutmahlzeit aus humanem Spenderblut, das zuvor zu gleichen Teilen mit FCS gemischt worden war. Die Blut-FCS-Mischung wurde hierzu in einseitig geöffnete, auf 37 ℃ temperierte Metallzylinder pip ettiert, die im Anschluss mit Parafilm verschlossen und mit dieser Seite auf den Mückenkäfig gestellt wurden. Die Mücken konnten den Parafilm durchstechen und so an das Blutgemisch gelangen. Zur Eiablage wurde den Mücken im Käfig ein feuchtes Filterpapier bereitgestellt. Zwei Tage nach der Blutmahlzeit konnten die auf dem Filterpapier abgelegten Eier in eine Schale mit Wasser überführt werden. Die geschlüpften Larven entwickelten sich innerhalb von etwa 10 Tagen zum Puppenstadium. Die Ernährung der Larven erfolgte während dieser Zeit mit Fischfutter. Die Puppenstadien wurden in eine kleine Schale mit Wasser überführt und in einen Zuchtkäfig gestellt. Innerhalb der folgenden zwei Tage schlüpften die adulten Tiere.

2.3.2.2 Infektion von Mücken mit P. berghei

Die Infektion von weiblichen *A. stephensi* Mücken mit *P. berghei* Parasiten erfolgte über eine Blutmahlzeit an einer infizierten Maus. Zunächst wurde hierfür eine NMRI-Maus über ein Blutstabilat mit *P. berghei* Parasiten infiziert. (siehe 2.3.1.1). Für die Blutmahlzeit sollte die Maus eine Parasitämie von ca. 10 bis 15 % sowie eine hohe Anzahl reifer Gametozyten aufweisen. Beides wurde vorher im Blutausstrich untersucht (siehe 2.1.1.2). Weiterhin wurde vor der Blutmahlzeit die Exflagellation der männlichen Gametozyten untersucht. Diese verlassen, ausgelöst durch die Temperaturveränderung von 37 °C auf Raumtemperatur, nach ca. 10 bis 15 min die Blutzellen, was mikroskopisch gut zu beobachten ist.

Für die Mückeninfektion wurden ca. 100 bis 150 der 3 bis 6 Tage alten weiblichen Mücken in Infektionskäfige überführt und mehrere Stunden ausgehungert. Die Maus

wurde mit Rompun/Ketavet (siehe 2.1.6) betäubt und anschließend für 30 bis 45 min auf den Mückenkäfig gelegt. Nach der Blutmahlzeit wurde die Maus durch CO₂ getötet. Für eine optimale Parasitenentwicklung wurden die Mücken bei 21 ℃ und einer Luftfeuchtigkeit von 80 % gehalten.

2.4 In vitro Infektionsmodell der Leberphase von P. berghei

2.4.1 Kultivierung von HepG2-Zellen

Für *in vitro* Experimente der Leberphase von *P. berghei* wurden Zellen der humanen, adhärent wachsenden Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 (European Collection Of Cell Culture) verwendet. Die Zellen wurden in 250 ml-Zellkulturflaschen in 25 ml Kulturmedium bei 37 $^{\circ}$ C /5 $^{\circ}$ CO $_2$ -Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter sterilen Bedingungen kultiviert. Zweimal wöchentlich wurde der Zellrasen mit sterilem PBS gewaschen und im Anschluss durch Behandlung mit 2 ml Accutase bei 37 $^{\circ}$ C abgelöst. Nach zehn Minuten wurde die Accutas e-Aktivität durch Zugabe von 8 ml Kulturmedium gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden bei 460 x g für 2 min sedimentiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 5 ml frischen Kulturmedium resuspendiert. Für die reguläre Kultivierung wurde 1 ml dieser Suspension in einer neuen 250 ml-Zellkulturflasche in 24 ml frisches Kulturmedium überführt.

Für Infektionsexperimente wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen anschließend in den gewünschten Verdünnungen in die Vertiefungen von Zellkulturschalen ausgesät. Zum Einsatz kamen hierbei Glasbodenkulturschalen sowie 24-*well*-Platten, die nach Bedarf zuvor mit Glasdeckgläschen versehen wurden. Je nach Fragestellung wurden zwischen 4×10^4 bis 8×10^4 Zellen ausgesät.

2.4.2 Präparation von P. berghei Sporozoiten

Von Tag 18 bis Tag 26 nach der Blutmahlzeit wurden weibliche, infizierte *A. stephensi* Mücken (siehe 2.3.2.2) für die Präparation von Speicheldrüsensporozoiten verwendet. Die Mücken wurden mit einem Saugrohr gefangen und danach mit Chloroform betäubt.

Zur oberflächlichen Desinfektion wurden die Mücken kurz in 70 %iges Ethanol getaucht. Im Anschluss wurden sie in PBS überführt. Die Präparation der zwei Speicheldrüsen aus dem Thorax erfolgte im Infektionsmedium unter dem Binokular bei 20 bis 50facher Vergrößerung mit Hilfe zweier Präzisions-Pinzetten. Die sechs Lappen des Speicheldrüsenapparates wurden anschließend mit den Pinzetten zerkleinert. Bei 400facher Vergrößerung konnte unter einem inversen Mikroskop die Anwesenheit von Sporozoiten überprüft werden.

Für die i.v. Injektion von Sporozoiten in Mäuse wurden die Speicheldrüsen in PBS präpariert und unzerkleinert in 100 µl eisgekühltes PBS überführt. Mit Hilfe eines motorbetriebenen Mikro-Pistills erfolgte die Homogenisierung der Speicheldrüsen. Die Anzahl der Sporozoiten wurde mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und im Anschluss durch Zugabe von PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

2.4.3 Infektion von HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen wurden einen Tag vor der Infektion in die jeweiligen Kulturschalen ausgesät und unter den beschriebenen Bedingungen kultiviert (siehe 2.4.1). Für die Infektion von Zellen in einer Glasbodenkulturschale wurden Sporozoiten aus drei bis vier infizierten Speicheldrüsen eingesetzt. Für die Infektion von Zellen in 24-*well*-Kulturplatten wurden hingegen pro Vertiefung ein bis drei infizierte Speicheldrüsen verwendet. Die Sporozoiten wurden in 200 µl Infektionsmedium zu den Zellen pipettiert und für mindestens zwei Stunden unter den beschriebenen Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit frischem Infektionsmedium gewaschen und abschließend mit 1 ml Infektionsmedium überschichtet. Die Zellen wurden bei 37 ℃ und 5 % CO₂ bis zum gewünschten Zeitpunkt kultiviert. In diesem Zeitraum erfolgte der Wechsel des Zellkulturmediums zweimal täglich.

2.5 Herstellung transgener *P. berghei* Parasiten

Die Herstellung transgener *P. berghei* Parasiten durch Transfektion von Blutschizonten erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll von Janse et al. (Janse et al., 2006b).

2.5.1 Schizonten-Übernachtkultur

Eine 6 bis 8 Wochen alte NMRI Maus wurde mit P. berghei Blutstadien Parasiten infiziert (siehe 2.3.1.1). Bei einer Parasitämie zwischen 1 bis 3 % wurde die Maus getötet und anschließend durch Herzpunktion ausgeblutet. Das Blut wurde in 5 ml 37 ℃ warmes Transfektionsmedium (siehe 2.1.6; vers etzt mit 300 µl Heparin und 50 µl Gentamicin (Stock 40 mg/ml)) überführt und mit diesem durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Die Suspension wurde anschließend für 8 min bei 450 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Medium und Mausserum wurde verworfen. Die sedimentierten roten Blutzellen wurden vorsichtig in 50 ml vorgewärmtem Transfektionsmedium resuspendiert. Die Suspension wurde tropfenweise zu 70 ml Transfektionsmedium in einer 500 ml Zellkulturflasche pipettiert. Anschließend wurde die Suspension für 90 s steril mit einem Gasgemisch (90 % N₂, 5 % O2, 5 % CO2) begast. Die Zellkulturflasche wurde luftdicht verschlossen und zur Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO 2 in den Inkubator verbracht, wo sie auf einen im Inkubator befindlichen Horizontalschüttler gestellt wurde. Dieser wurde 15 min nach Beginn der Inkubation angestellt. Durch die langsamen Schwenkbewegungen sollte ein Absetzen der roten Blutzellen verhindert werden. Innerhalb von 18 Stunden entwickelten sich so reife Schizonten. Bei P. berghei platzen die Schizonten in Kultur nicht auf und können somit über diese Methode angereichert werden. Am nächsten Morgen wurde im Blutausstrich überprüft, ob die Kultur ausreichend Schizonten enthielt.

2.5.2 Isolierung der Schizonten mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Trennung reifer Schizonten von nicht infizierten Blutzellen und jungen Blutstadien erfolgte über Dichtegradientenzentrifugation mit einem Nycodenzgradienten. Hierzu wurden zunächst 27,5 ml Nycodenz-Stocklösung (siehe 2.1.6) mit 22,5 ml PBS gemischt. Die Schizontenkultur wurde zu gleichen Teilen auf vier 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt (ungefähr 30 ml pro Gefäß) und anschließend vorsichtig mit jeweils 10 ml Nycodenz-PBS-Lösung unterschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte in einer Schwingrotorzentrifuge bei 450 x g (20 min, RT) mit minimaler Beschleunigung und ausgeschalteter Bremse. Nach der Zentrifugation waren die Schizonten an der Grenzschicht zwischen Nycodenzlösung und Medium als brauner Ring zu erkennen. Mit einer Glaspipette wurden die Schizonten vorsichtig

abgesaugt und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Nycodenz-Resten wurde die Schizontensuspension mit frischem Transfektionsmedium auf 40 ml aufgefüllt und die Schizonten anschließend für 8 min bei 450 x g sedimentiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Schizontensediment in der benötigten Menge Transfektionsmedium (1 ml pro Transfektionsansatz) resuspendiert. Jeweils 1 ml Schizontensuspension wurde anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Schizonten wurden durch eine kurze Zentrifugation (11.000 x g, 10 s) erneut sedimentiert. Der Überstand verblieb bis zur weiteren Verwendung zunächst über dem Schizontensediment.

2.5.3 Elektrotransfektion von P. berghei Schizonten

Für die Transfektion von *P. berghei* Schizonten wurden 6 bis 8 μg linearisierte Plasmid-DNA mit einem maximalen Volumen von 10 μl eingesetzt. Die DNA wurde mit 100 μl Nucleofector™ Lösung aus dem Human T Cell Nucleofector™ Kit gemischt. Das Schizontensediment wurde in der Nucleofector™-DNA-Lösung resuspendiert und die Suspension mit Hilfe der mitgelieferten Pipette in die Elektroporationsküvette überführt. Die Elektrotransfektion erfolgte mit dem Programm U-033 im Nucleofector™ (Lonza, Köln, D). Direkt nach der Elektroporation wurden der Schizontensuspension 50 μl Transfektionsmedium hinzugefügt. Mit der mitgelieferten Pipette wurde die Suspension wieder aus der Elektroporationsküvette entnommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde luftblasenfrei in eine Insulinspritze aufgezogen und anschließend in die Schwanzvene einer 6 bis 8 Wochen alten NMRI-Maus injiziert.

2.5.4 Selektion transgener Parasiten

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren zur Herstellung transgener *P. berghei* Parasiten (siehe 2.2.16.3, 2.2.16.4 und 2.2.16.5) vermitteln eine Resistenz gegen das Malariamedikament Pyrimethamin. Somit war es möglich, nicht transfizierte Wildtypparasiten durch Behandlung mit Pyrimethamin zu entfernen. Ungefähr 24 bis 30 Stunden nach der Transfektion erhielt die infizierte Maus mit Pyrimethamin (Endkonzentration 70 μg/ml) versetztes Trinkwasser. Etwa 7 bis 10 Tage nach der Transfektion hatten sich die Parasiten genügend vermehrt, um im Blutausstrich nachgewiesen werden zu können. Bei einer Parasitämie >2 % wurden Blutstabilate hergestellt (siehe 2.3.1.3).

2.5.5 Subklonierung transgener Parasiten durch limiting dilution

Zur Subklonierung transgener *P. berghei* Parasiten wurde das Verfahren der *limiting dilution* angewandt.

Eine 6 bis 8 Wochen alte NMRI-Maus wurde mit transgenen *P. berghei* Blutstadien infiziert (siehe 2.3.1.1). Zur Reduzierung des Anteils von nicht-transgenen Parasiten wurde 24 bis 30 h nach Infektion mit einer Pyrimethaminselektion (siehe 2.5.4) begonnen. Der Parasitämieverlauf wurde im Blutausstrich kontrolliert. Bei einer Parasitämie zwischen 0,2 bis maximal 1 % wurde die Subklonierung durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein Tropfen Blut aus der Schwanzvene der infizierten Maus in 10 ml vorgewärmtes RPMI1640-Medium (20 % FCS) überführt. Die Konzentration der roten Blutzellen in den 10 ml Medium wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Über die Parasitämie und die Konzentration der roten Blutzellen konnte die Parasitenanzahl pro ml Medium berechnet werden. Durch Verdünnung der Parasitenlösung mit vorgewärmten RPMI1640-Medium (20 % FCS) wurde im Anschluss die eigentliche Injektionslösung hergestellt.

Zur Subklonierung der Parasiten wurden zehn 6 bis 8 Wochen alten NMRI-Mäusen jeweils 100 µl Injektionslösung in die Schwanzvene injiziert. Statistisch sollten demzufolge bei der Verwendung einer verdünnten Injektionslösung von 0,6 bis 0,9 Parasiten/100 µl 6 bis 9 Mäuse eine Parasitämie entwickeln. Dieser Anteil war in der Praxis jedoch deutlich geringer.

Die Mäuse, die eine Parasitämie entwickelten, wurden bei einer Parasitämie >2 % getötet und ihr Blut anschließend durch Herzpunktion entnommen. Von einem Teil des Blutes wurden Stabilate hergestellt (siehe 2.3.1.3). Das restliche Blut wurde für die Isolierung von Parasiten gDNA verwendet. Anhand der gDNA erfolgte anschließend mittels PCR die Überprüfung des Erfolges der Subklonierung.

2.6 Herstellung attenuierter *P. berghei* Sporozoiten durch γ -Bestrahlung (RAS)

P. berghei Wildtypsporozoiten wurden aus den Speicheldrüsen infizierter *A. stephensi* Mücken isoliert und gezählt (siehe 2.4.2). Anschließend wurden die Sporozoiten in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis einer Strahlungsdosis von 10.000 rad in einem γ -Bestrahlungsgerät (STS Braunschweig, D) ausgesetzt. Als γ -Strahlungsquelle diente 137 Cs. Danach wurden die bestrahlten Sporozoiten zu Immunisierungszwecken in der gewünschten Konzentration i.v. in Balb/c bzw. C57BL/6 Mäuse injiziert.

2.7 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

2.7.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von infizierten HepG2-Zellen

2.7.1.1 Fixierung

Zum gewünschten Zeitpunkt nach Infektion wurden auf Glasdeckgläschen gewachsene, mit *P. berghei* Parasiten infizierte HepG2-Zellen (siehe 2.4.3) einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 500 μl 4 % Paraformaldehyd (20 min bei RT) fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der fixierten Zellen wurden diese anschließend für mindestens 10 min bei -20 ℃ in 500 μl eiskaltem Methanol inkubiert. Vor der weiteren Verwendung wurden die fixierten Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen.

2.7.1.2 Färbung

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die fixierten Zellen (siehe 2.7.1.2) vor der eigentlichen Färbung für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur in 10 % FCS/PBS inkubiert. In dieser Zeit wurden Verdünnungen und Mischungen der benötigten Primärantikörper in 10 % FCS/PBS hergestellt. Des Weiteren wurde eine Färbekammer präpariert, in der die spätere Inkubation der Zellen mit der Primärantikörperlösung erfolgen sollte. Hierzu wurde eine verschließbare Schale mit feuchten Tüchern ausgelegt und auf die Tücher ein Streifen Parafilm platziert. 50 µl Tropfen der Primärantikörpermischung wurden auf den Parafilm pipettiert. Die Glasdeckgläschen wurden aus der Blockierlösung genommen und vorsichtig mit der Zellseite nach unten in die Tropfen gelegt. Die Inkubation der fixierten Zellen mit den Primärantikörpern erfolgte in der geschlossenen Färbekammer bei 4 ℃ über Nacht. Nach der Inkubation wurden die Glasdeckgläschen zurück in eine 24-well-Kulturschale überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Die benötigten Sekundärantikörper sowie der DNA-Farbstoff DAPI wurden in 10 % FCS/PBS verdünnt, gemischt und anschließend als 50 µl Tropfen auf einen frischen Streifen Parafilm in der Färbekammer pipettiert. Die Glasdeckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten in die Tropfen gelegt und so für eine Stunde an einem dunklen Ort bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen wieder dreimal mit PBS gewaschen, zum Abschluss einmal kurz in dH_2O getaucht und anhaftende Flüssigkeit mit einem Papiertuch durch vorsichtiges Antupfen am Rand des Deckgläschens entfernt. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen *Dako Fluorescent Mounting* Medium aufgebracht. In diesen wurde das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten luftblasenfrei gelegt. Zum Aushärten des *Mounting* Mediums erfolgte eine Lagerung der Objektträger über Nacht bei $4\ \column{c}{C}$.

2.7.2 Lebendmikroskopie

2.7.2.1 Messung der Parasitengröße – density slicing

In einer 24-well-Kulturplatte wurden HepG2-Zellen mit transgenen Sporozoiten infiziert (siehe 2.4.3). An den zu analysierenden Zeitpunkten wurden Fluoreszenzmikroskopie (20fache Vergrößerung; Axiovert 200, Zeiss) über eine angeschlossene Kamera Fluoreszenzbilder von Parasiten aufgenommen (mind. 30 pro Vertiefung). Die Expositionszeit wurde zu Beginn festgelegt und für alle folgenden Aufnahmen des entsprechenden Zeitpunktes beibehalten. Mit Hilfe des Openlab (5.0.2.) Moduls density slicing konnte über die erhaltenen Fluoreszenzsignale die Fläche der Parasiten ermittelt werden. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism graphisch aufgetragen und statistisch ausgewertet.

2.7.2.2 Zählen abgelöster Zellen

In einer 24-well-Kulturplatte wurden HepG2-Zellen mit Sporozoiten infiziert und unter Zellkulturbedingungen inkubiert (siehe 2.4.3). Zur Ermittlung des Ausgangswertes (= 100 %) wurden 24 h nach der Infektion mittels Fluoreszenzmikroskopie (20fache Vergrößerung) alle infizierten Zellen gezählt. Ab etwa 65 hpi ist bei *P. berghei in vitro* Kulturen die Abknospung von Merosomen sowie abgelöster Zellen zu beobachten. Zur Bestimmung der Anzahl abgelöster Zellen wurde deshalb 66 h nach der Infektion mit Hilfe einer 1 ml Pipette vorsichtig der Zellkulturüberstand abgesaugt und in eine neue Vertiefung pipettiert. Der verbliebene Zellrasen wurde mit frischem Infektionsmedium (siehe 2.1.6) überschichtet und unter normalen Zellkulturbedingungen weiter inkubiert. Um beim Zählen zwischen abgelösten Zellen und Merosomen unterscheiden zu

können – letztere enthalten keine Wirtszell-DNA – wurde die DNA der im entnommenen Überstand befindlichen Zellen angefärbt. Hierzu wurde Hoechst 33342 zu den Zellen pipettiert (Endkonzentration im Medium 1 μ g/mg). Nach einer kurzen Inkubation (5-10 min, 37 °C, 5 % CO $_2$) wurden die abgelösten Zellen bei einer 20fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. 72 h nach Infektion wurde erneut der Zellkulturüberstand der infizierten Zellen entnommen und die abgelösten Zellen darin analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise gezählt.

2.7.2.3 Konfokale Videomikroskopie – Aufnahme von Zeitfolgen

In einer Glasbodenkulturschale wurden zwischen 8x10⁴ bis 1x10⁵ HepG2-Zellen ausgesät, einen Tag später mit Sporozoiten infiziert und anschließend für die mikroskopischen Analysen eingesetzt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Videomikroskopieexperimente mussten die Zellen/Parasiten nicht weiter mit Zellfarbstoffen angefärbt werden, da hier ausschließlich die GFP-Fluoreszenz der transgenen Parasiten von Interesse war. Die Aufnahmen wurden unter Verwendung eines 63fach Objektivs am konfokalen Linienscanner Mikroskop (LSM5 Live, Zeiss) gemacht. Für die Aufnahmen wurde das ZEN MultiTime Modul verwendet. Dieses ermöglichte automatische Zeitrafferaufnahmen (in dieser Arbeit: Zeitabstände von 10-15 min) von Parasiten. Die Zellen befanden sich während der gesamten Versuchsdauer in einer Inkubationskammer bei 37 ℃ und 5 % CO₂. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Programms ImageJ bearbeitet.

3 Ergebnisse

Die Entwicklung genetisch attenuierter Plasmodiumparasiten nimmt bei der Suche nach einem effizienten Malariaimpfstoff einen hohen Stellenwert ein. Gegenüber so genannter *subunit*-Impfstoffe, wie z.B. dem derzeit ersten kurz vor der kommerziellen Zulassung stehenden Malariaimpfstoff RTS/S (Cohen et al., 2010), bieten attenuierte Parasiten ein großes Reservoir verschiedenster Antigene, die dem Immunsystem präsentiert werden können (Borrmann and Matuschewski, 2011). Bisher konnten bereits verschiedene genetisch veränderte Parasiten hergestellt werden, die, bedingt durch die Deletion eines oder mehrerer essentieller Gene, in einem bestimmten Entwicklungsstadium arretieren und im Tiermodel eine protektive Immunantwort erzeugen (Labaied et al., 2007; Mueller et al., 2005a; Mueller et al., 2005b; Pei et al., 2010; van Dijk et al., 2005; Vaughan et al., 2009a; Yu et al., 2008).

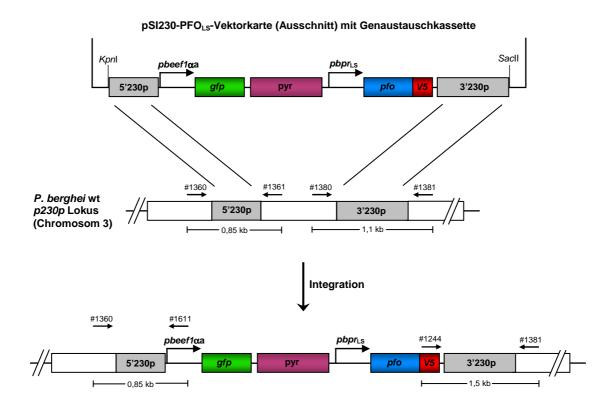
Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein neuer Ansatz zur genetischen Attenuierung von Plasmodiumparasiten verfolgt. Unter Verwendung eines in der Arbeitsgruppe charakterisierten stadienspezifischen Promotors (Helm et al., 2010) sollten transgene *P. berghei* Parasiten hergestellt werden, die in der späten Leberphase ein für sie toxisches Protein exprimieren. Die Toxinexpression sollte eine Attenuierung der transgenen Parasiten in der späten Leberphase bewirken. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte zur Herstellung doppelt attenuierter Parasiten die Toxinexpression mit der Deletion eines putativ essentiellen *P. berghei* Gens kombiniert werden.

3.1 Attenuierung von *P. berghei* Parasiten durch leberphasenspezifische Expression von Perfringolysin O

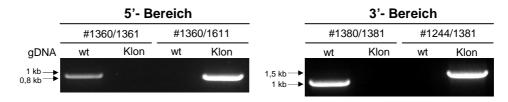
Bereits im Vorwege dieser Arbeit wurde, bei der Suche nach einem für *P. berghei* Leberstadien geeigneten Toxin, vermutet, dass eine vorzeitige Zerstörung der PVM vor Abschluss der Merozoitenbildung für die Parasiten letal ist. Aus diesem Grund sollte zunächst das porenformende Protein PFO in die PVM eingebaut werden.

Zur Herstellung PFO-exprimierender Parasiten wurde der pSI230-PFO_{LS}-Vektor (siehe 2.2.16.3 und Abb. 3.1A) eingesetzt. Dieser Vektor erlaubt in den transgenen Parasiten eine leberphasenspezifische Expression von PFO als V5-Fusionsprotein sowie eine konstitutive Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP).

A Integrationsschema



B Integrations-PCR



C RT-PCR

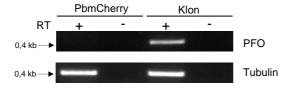


Abb. 3.1: Herstellung einer PFO-exprimierenden Parasitenlinie - PbPFO_{LS}

A) Schematische Darstellung: Das Genaustauschkonstrukt (bestehend aus den flankierenden 5' und 3'230p-Sequenzen, einer Pyrimethaminresistenzkassette, sowie einer Kassette zur konstitutiven Expression von GFP und einer Kassette zur leberphasenspzifischen Expression von PFO als Fusionsprotein mit C-terminalem V5-tag) wurde durch Restriktion mit *Kpn*I und SacII aus dem pSI230-PFO_{LS}-Vektor ausgeschnitten und anschließend in *P. berghei* Parasiten transfiziert. Über homologe Rekombination integrierte das Genaustauschkonstrukt in den p230p-Lokus. Die 3'dhfr/ts-Bereiche sind der Übersichtlichkeit halber in dieser Darstellung nicht mit abgebildet.

Fortsetzung nächste Seite

Abb. 3.1 Herstellung einer PFO-exprimierenden Parasitenlinie - PbPFO_{LS} Fortsetzung

- **B)** gDNA aus Wildtyp- bzw. aus subklonierten PbPFO $_{LS}$ -Parasiten (Klon) wurde für eine Integrations-PCR mit spezifischen Oligonukleotid-*primer*-Kombinationen eingesetzt:
- #1360/#1361 und #1380/#1381: Wildtypkontrolle (spezifisch für *p230p*-Lokus),
- #1360/#1611 und #1244/#1381: Integrationskontrolle (spezifisch für eine erfolgreiche Integration des Genaustauschkonstrukts). Die erwarteten PCR-Produktgrößen sowie die Oligonukleotid-*primer*-Bindungsstellen sind in A) eingezeichnet.
- **C)** HepG2-Zellen wurden mit Kontroll- (PbmCherry) bzw. mit PbPFO_{LS}-Sporozoiten infiziert. 30 hpi wurde die Gesamt-RNA der infizierten Zellen isoliert und für eine RT-PCR-Analyse eingesetzt. Zur Kontrolle der cDNA wurde eine RT-PCR mit PbTubulin spezifischen Oligonukleotid-*primern* (#1344/#1345) durchgeführt. Der Nachweise von *pfo*-cDNA erfolgte unter Verwendung der Oligonukleotid-*primer* #1938/#1939. Zur Kontrolle von Verunreinigung durch genomische DNA wurden PCR Ansätze ohne reverse Transkriptase (-RT) durchgeführt.

Die pSI230-PFO_{LS}-Plasmid-DNA wurde linearisiert und anschließend in *P. berghei* Wildtyp (wt) Parasiten transfiziert. In den Parasiten erfolgte über Doppel-*crossover* eine stabile Integration des Genaustauschkonstrukts in den nicht essentiellen *p230p*-Lokus. Hierbei wurden ca. 1 kb des *p230p-orf* deletiert und durch die Expressionskassette ersetzt (Abb. 3.1A).

Durch eine *limiting dilution* Subklonierung wurde nach der Transfektion eine klonale Parasitenlinie (PbPFO_{LS}) hergestellt. Durch PCR-Analysen mit spezifischen Oligonukleotid-*primern* wurde verifiziert, dass das Genaustauschkonstrukt erfolgreich in den *p230p*-Lokus integriert hatte und es sich tatsächlich um einen Klon handelte (Abb. 3.1B). Die Verwendung von *p230p*-Lokus-spezifischen Oligonukleotid-*primer*-Kombinationen (#1360/#1361; #1380/#1381) führte nur bei *P. berghei* Wildtypparasiten zu einem PCR-Produkt, aber nicht bei PbPFO_{LS}-Parasiten. Im Gegensatz hierzu kam es bei der Verwendung von integrationsspezifischen Oligonukleotid-*primer*-Kombinationen (#1360/#1611; #1244/#1381) nur bei PbPFO_{Ls}-Parasiten zur Bildung von PCR-Produkten.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die PbPFO_{LS}-Parasiten das *pfo*-Transgen in der Leberphase transkribieren. Hierzu erfolgte zunächst die Infektion humaner Hepatomazellen (HepG2) mit PbPFO_{LS}-Sporozoiten. 30 hpi (<u>hours post infection</u>) wurde die Gesamt-RNA aus den infizierten HepG2-Zellen isoliert und anschließend für eine RT-PCR mit *pfo*-spezifischen Oligonukleotid-*primern* (#1938/#1939) eingesetzt. Die Bildung eines PCR-Produkts der erwarteten Größe (428 bp) konnte bei cDNA aus PbPFO_{LS}-Parasiten beobachtet werden (Abb. 3.1C; Klon, +RT). Um eine gDNA-Kontamination der Probe und somit ein falsch positives Ergebnis auszuschließen, wurde parallel ein Kontrollansatz ohne Zugabe von reverser Transkriptase angesetzt (-RT). Sowohl bei dieser Kontrolle, als auch bei cDNA und RNA aus Kontrollparasiten

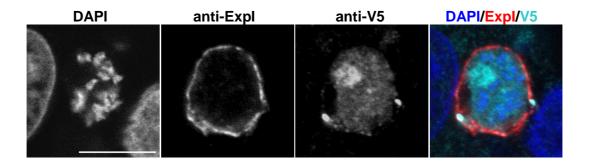


Abb. 3.2: PbPFO_{LS}-Parasiten exprimieren PFO::V5-Fusionsproteine
HepG2-Zellen wurden mit PbPFO_{LS} Sporozoiten infiziert und 40 hpi fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-Expl- (Huhn) und Anti-V5-Antikörpern (Maus) inkubiert. Die Färbung erfolgte im Anschluss durch Inkubation mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern

erfolgte im Anschluss durch Inkubation mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Huhn-Alexa Fluor® 594 (Rot) und Anti-Maus-Cy5 (Cyan) sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (Blau). Zur besseren Kontrastierung sind die Einzelbilder in Graustufen dargestellt. Bei den Bildern handelt es sich um konfokale Aufnahmen. Der Größenbalken entspricht 10 µm.

(PbmCherry) kam es erwartungsgemäß nicht zur Bildung eines PCR-Produkts (Abb. 3.1C). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die PbPFO_{LS}-Parasiten das *pfo*-Transgen in der Leberphase transkribieren.

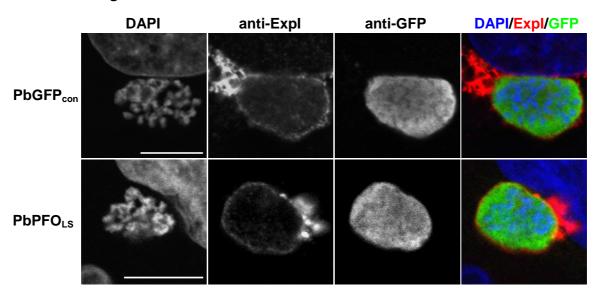
Da das exprimierte PFO ein C-terminales V5-Epitop enthielt,, konnten indirekte Immunfluoreszenzanalysen (IFA) unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Anti-V5-Antikörpers durchgeführt werden (Abb. 3.2).

Trotz einer vorhandenen Signalsequenz (Tweten, 1988) wurde das PFO::V5-Fusionsprotein überwiegend homogen im Zytosol des Parasiten verteilt gefunden. Weiterhin konnte vereinzelt eine punktuelle Kolokalisation von PFO::V5 mit dem PVM-Marker Expl beobachtet werden. Allerdings scheint die PVM, dort wo das Fusionsprotein besonders stark akkumuliert, schon perforiert zu sein. Demnach wird ein Teil der Fusionsproteine entsprechend der Signalsequenz tatsächlich vom Parasiten sezerniert und dann auch in die PVM transportiert.

Diese Ergebnisse, zusammen mit den Ergebnissen der RT-PCR-Analyse, zeigten überzeugend, dass die PbPFO_{LS}-Parasiten PFO::V5 in der Leberphase exprimierten. Ob die PFO-Expression tatsächlich zur Lyse der PVM führt, wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht.

Während der frühen Schizogonie (30 hpi) waren viele PbPFO_{LS}-Parasiten nicht von Kontrollparasiten zu unterscheiden (Abb. 3.3, obere Bildreihen). 48 h nach Infektion von HepG2-Zellen mit PbPFO_{LS}-Sporozoiten war das Parasiten-produzierte GFP jedoch nahezu über die gesamte Wirtszelle verteilt (Abb. 3.3, untere Bildreihen). Demnach ermöglichte die PFO::V5-Expression offensichtlich die Freisetzung von GFP-

Frühe Schizogonie



Späte Schizogonie

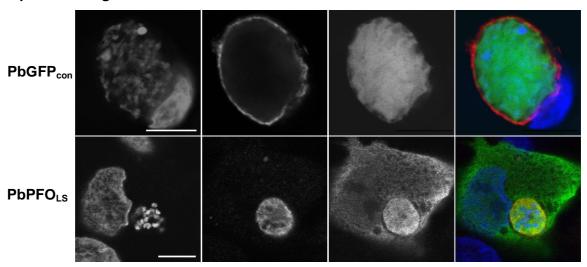


Abb. 3.3: $PbPFO_{LS}$ -Parasiten zeigen einen veränderten Phänotyp in der späten Leberphase

HepG2-Zellen wurden mit PbGFP $_{con}^-$ bzw. mit PbPFO $_{LS}$ -Sporozoiten infiziert und 30 hpi (frühe Schizogonie) und 48 hpi (späte Schizogonie) fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-Expl- (Huhn) und Anti-GFP-Antikörpern (Kaninchen) inkubiert. Die Färbung erfolgte im Anschluss durch Inkubation mit den fluorophorgekoppelten Anti-Huhn-Alexa Fluor $^{\circledR}$ 594 (Rot) und Anti-Kaninchen-Cy2-Antikörpern (Grün) sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (Blau). Dargestellt sind PbPFO $_{LS}$ -Parasiten und Kontrollparasiten in der frühen (obere Bildreihen) und in der späten Leberphase (untere Bildreihen).

Zur besseren Kontrastierung sind die Einzelbilder in Graustufen dargestellt.

Konfokale Aufnahmen; Größenbalken: 10 µm

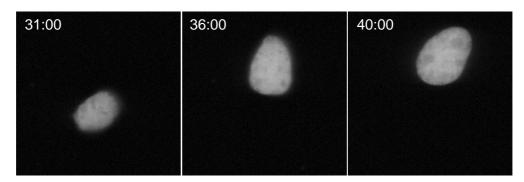
Proteinen aus dem Parasiten- ins Wirtszellzytosol. Dies sprach für eine PFO::V5-induzierte Perforation der PVM und der PPM. Auffällig war außerdem, dass die Anzahl der Parasitenzellkerne im Vergleich zu den Kontrollparasiten deutlich geringer war. Auch die Färbung des PVM-Proteins Expl verdeutlichte Unterschiede zwischen den

beiden Parasitenlinien. Während Expl bei den Kontrollparasiten in die PVM sezerniert wurde, blieb es bei einigen PbPFO_{LS}-Parasiten auf das Parasitenzytosol beschränkt. Teilweise konnte Expl in PbPFO_{LS}-Parasiten gar nicht mehr oder nur punktuell verteilt im Wirtszellzytosol nachgewiesen werden. Interessanterweise waren bei einigen PbPFO_{LS}-Parasiten, bei denen die PVM schon beschädigt war, Bereiche um den Parasiten zu beobachten, die GFP-negativ waren, was darauf hindeutete, dass die Parasiten immer noch von einer Membran umgeben wurden. Ob es sich dabei um die PVM handelte, kann allerdings nicht gesagt werden, da sie das Markerprotein Expl nicht enthielt.

Um die GFP-Freisetzung in die Wirtszelle während und nach PVM-Ruptur genauer zu analysieren, wurde mittels konfokaler Videomikroskopie eine Zeitreihe von HepG2-Zellen, die mit Kontroll- (PbGFP_{con}-) bzw. mit PbPFO_{LS}-Parasiten infiziert waren, aufgenommen. Das Experiment wurde 31 hpi gestartet. Während bei den Kontrollparasiten im zeitlichen Verlauf des Experiments lediglich eine Zunahme der Parasitengröße festzustellen war, konnte bei den PbPFO_{LS}-Parasiten bereits eine Stunde nach Beginn des Experiments eine schwache GFP-Fluoreszenz außerhalb des Parasiten in der Wirtszelle beobachtet werden (Abb. 3.4B). Die GFP-Fluoreszenz im Parasiten nahm binnen kurzer Zeit stark ab, während die GFP-Fluoreszenz in der Wirtszelle parallel hierzu intensiver wurde, so dass bereits nach 20 Minuten die GFP-Fluoreszenz in Parasit und Wirtszelle gleich verteilt war. Dennoch konnte der Parasit bis zum Ende des Experiments (40 hpi) innerhalb der Wirtszelle neben dem Wirtszellkern als klar umgrenzte Struktur beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen damit die Beobachtungen der Immunfluoreszenzanalyse.

Sowohl in *Plasmodium* als auch in den hierzu nah verwandten *T. gondii* Parasiten zieht die Ruptur der PVM am Ende der intrazellulären Entwicklung den Tod der Wirtszelle nach sich. Dagegen schien die vorzeitige, PFO-vermittelte PVM-Ruptur die PbPFO_{LS}-infizierten Wirtszellen nicht zu beeinträchtigen. Vielmehr konnte vereinzelt sogar eine normale Zellteilung der Wirtszellen beobachtet werden.

A Kontrolle (PbmCherry)



B PbPFO_{LS}

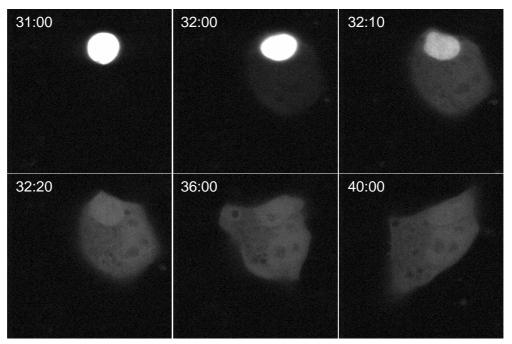


Abb. 3.4: GFP aus den PbPFO $_{LS}$ -Parasiten gelangt kurz nach Beginn der PFO-V5 Expression in die Wirtszelle

HepG2-Zellen wurden mit PbmCherry- (A) bzw. mit PbPFO_{LS}-Sporozoiten (B) infiziert. Ab 31 hpi wurden in zehnminütigen Abständen konfokale Fluoreszenzbilder der Parasiten aufgenommen. Die Zellen wurden während dieser Zeit unter normalen Zellkulturbedingungen (5 %CO $_2$, 37 °C) inkubiert.

Lebendmikroskopie, konfokales Laserscanning Mikroskop (Linienscanner)

Sowohl in der Immunfluoreszenzanalyse als auch in der Lebendmikroskopie konnte somit beobachtet werden, dass es bei den PbPFO_{LS}-Parasiten zu einer Ruptur der PVM und einer GFP-Freisetzung aus dem Parasitenzytosol in die Wirtszelle kommt. An diese Beobachtungen anknüpfend stellte sich die Frage, ob auch andere Proteine des Parasiten in das Wirtszellzytosol gelangen können. Dieses wäre insofern wichtig, weil Proteine, die sich im Wirtszellzytosol befinden, prozessiert und über MHC-Klasse-I Moleküle dem Immunsystem präsentiert werden können. Eine größere Vielfalt von

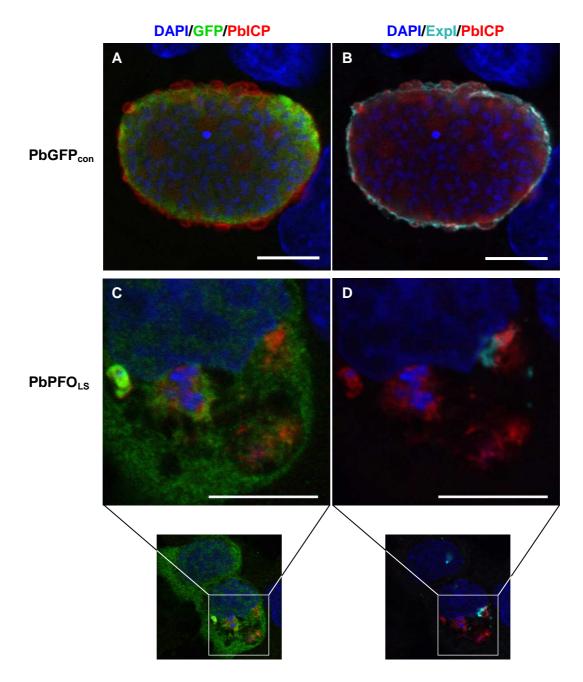


Abb. 3.5: PbICP ist nach der PVM/PPM-Perforation im Wirtszellzytosol PbPFO_{LS}-infizierter Zellen nachweisbar

HepG2-Zellen wurden mit PbGFP $_{\text{con}^-}$ bzw. PbPFO $_{\text{LS}^-}$ Sporozoiten infiziert und nach 48 hpi fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-Expl- (Huhn), Anti-GFP- (Kaninchen) und Anti-PbICP-c-Antikörpern (Ratte) inkubiert. Die Färbung erfolgte im Anschluss durch Inkubation mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Huhn-Cy5 (Cyan), Anti-Kaninchen-Cy2 (Grün) und Anti-Ratte-Alexa Fluor 594 (Rot) sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (Blau). Dargestellt sind für jeden Parasiten jeweils zwei unterschiedliche Überlagerungsbilder. C und D stellen Vergrößerungsaufnahmen des in den kleineren Bildern markierten Ausschnitts dar. Konfokale Aufnahmen; Größenbalken: 10 μ m

Parasitenproteinen im Wirtszellzytosol könnte ein größeres Antigenspektrum und somit eine weiter gefächerte Immunantwort bedeuten.

Die Freisetzung von Parasitenproteinen in die Wirtszelle sollte exemplarisch anhand von PbICP (Rennenberg et al., 2010) untersucht werden, einem Protein, welches in der

gesamten Leberphase exprimiert wird. In PbGFP_{con}-Parasiten (Kontrolle) kolokalisierte PbICP nach 48 hpi vorwiegend mit dem PVM-Markerprotein Expl, war aber auch im Parasitenzytosol nachweisbar (Abb. 3.5A, B).

In PbPFO_{LS}-Parasiten konnte eine solche PbICP-Lokalisation hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 3.5C, D). PbICP war um die Parasitenzellkerne lokalisiert. Teilweise war auch eine stärkere PbICP-Färbung in der Nähe der verbliebenen Expl-Färbung und frei im Wirtszellzytosol zu beobachten. Exemplarisch konnte anhand von PbICP also gezeigt werden, dass die PFO-induzierte PVM- und PPM-Ruptur die Freisetzung von Parasitenproteinen in das Wirtszellzytosol ermöglicht.

Obwohl PbPFO_{LS}-Parasiten in der Lage waren, Leberschizonten zu bilden, konnten die typischen Membraninvaginationen zum Ende der Schizogonie hingegen nicht beobachtet werden. Deshalb sollte analysiert werden, ob die PbPFO_{LS}-Parasiten noch Proteine später Leberstadien exprimieren können. Dieses wurde exemplarisch anhand der putativen Protease PbSERA2 untersucht, einem Protein, welches erst in der späten Leberphase (*in vitro* ab ca. 48 hpi) exprimiert wird (Schmidt-Christensen et al., 2008).

In Kontrollparasiten, die das späte Schizogoniestadium (48 hpi) erreicht hatten, konnten SERA2-Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper angefärbt und nachgewiesen werden. Die SERA2-Proteine waren wie erwartet im Parasitenzytosol und in der PVM lokalisiert (Abb. 3.6A und 3.6B).

Bei dem in Abb. 3.6C und 3.6D gezeigten PbPFO_{Ls}-Parasiten konnten ebenfalls SERA2-Proteine nachgewiesen werden. Allerdings waren die SERA2-Proteine hier in Form von kleinen, granulären Strukturen innerhalb des Parasitenzytosols lokalisiert und waren nicht, wie bei den Kontrollparasiten, ringförmig um den Parasiten verteilt. Eine deutliche Lokalisation im Wirtszellzytosol, wie sie bereits für GFP und PbICP beobachtet wurde, konnte für SERA2 nicht bestätigt werden. Es ist allerdings möglich, dass die Konzentration von SERA2-Proteinen außerhalb des Parasiten unter der Nachweisgrenze der IFA lag. Auch im Parasiten selbst war die SERA2-Färbung relativ schwach (Abb. 3.6D). Dies lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf die erst ab 48 hpi beginnende Expression von SERA2-Proteinen zurückführen. Festzuhalten bleibt aber, dass die Parasiten in der Lage sind, auch Proteine der späten Leberphase zu exprimieren.

Expl war nicht rund um den Parasiten in einer PVM, sondern punktuell innerhalb des Wirtszellzytosols verteilt.

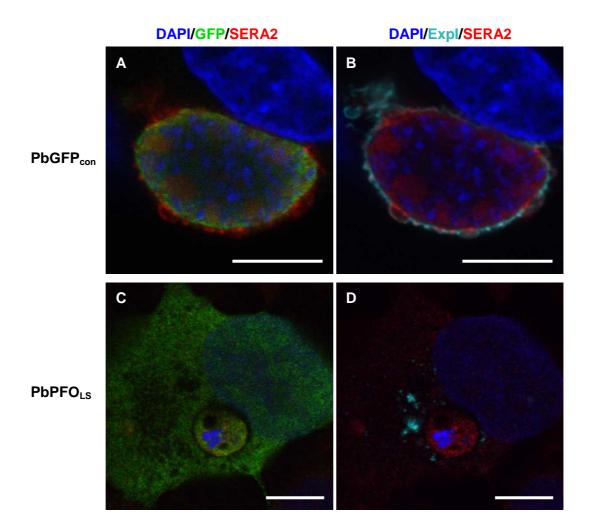


Abb. 3.6: PbPFO_{LS}-Parasiten exprimieren SERA2 – ein Protein der späten Leberphase HepG2-Zellen wurden mit PbGFP_{con}- bzw. PbPFO_{LS}-Sporozoiten infiziert und nach 48 hpi fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-Expl- (Huhn), Anti-GFP- (Kaninchen) und Anti-SERA2-Antikörpern (Ratte) inkubiert. Die Färbung erfolgte im Anschluss durch Inkubation mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Huhn-Cy5 (Cyan), Anti-Kaninchen-Cy2 (Grün) und Anti-Ratte-Alexa Fluor® 594 (Rot), sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (Blau). Konfokale Aufnahmen; Größenbalken: 10 μ m

Wie in Abb. 3.6C anhand der GFP-Färbung beobachtet werden konnte, war der Parasit deutlich von der Wirtszelle abgrenzbar. Obwohl die gesamte Wirtszelle zu diesem Zeitpunkt bereits eine GFP-Fluoreszenz aufwies, befand sich der Parasit in einem GFP-freien Bereich, was die Beobachtungen früherer Experimente bestätigt.

Es ist an dieser Stelle noch einmal hervorzuheben, dass keine der untersuchten Wirtszellen Anzeichen für einen kurz bevorstehenden Zelltod aufwiesen, wie z.B. die Kondensation und Fragmentierung des Wirtszellkerns.

Zur weiteren Charakterisierung der PbPFO_{LS}-Parasiten folgten Experimente zur Quantifizierung der beobachteten Phänotypen. Hierbei sollte zunächst der zeitliche

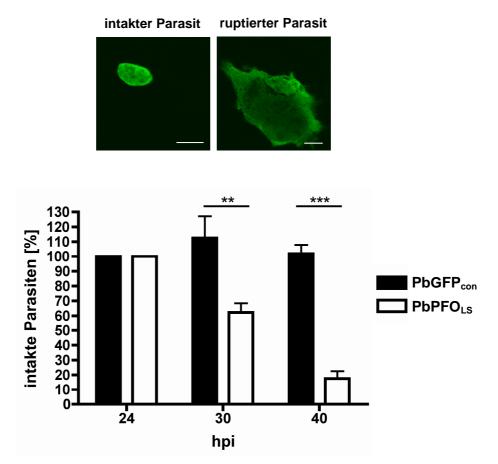


Abb. 3.7: Quantifizierung intakter *P. berghei* Parasiten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion

HepG2-Zellen wurden in den Vertiefungen einer 24-well Zellkulturschale mit PbGFP $_{con}$ – bzw. mit PbPFO $_{LS}$ -Sporozoiten infiziert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte 24 hpi, 30 hpi und 40 hpi die Zählung aller intakten Parasiten. Parasiten, die GFP schon in das Wirtszellzytosol freigesetzt hatten, wurden nicht gezählt. Wie die beiden unterschiedlichen Phänotypen definiert wurden, soll anhand der Fluoreszenzaufnahmen (s.o.) verdeutlicht werden. Die intakten Parasiten (Bild oben links) zeigten eine auf den Parasiten beschränkte GFP-Verteilung. Bei den PbPFO $_{LS}$ -Parasiten (Bild oben rechts) war die GFP-Fluoreszenz auf die gesamte Wirtszelle verteilt. Vereinzelt war der Parasit in diesen Zellen noch erkennbar.

Angegeben sind die Ergebnisse in % +SD bezogen auf die 24 hpi Werte. Die Anzahl der Parasiten, die 24 hpi gezählt wurden, wurde hierzu auf 100 % gesetzt. Angegeben sind die Ergebnisse aus 5 unabhängigen Experimenten. **: P < 0.01; ***: P < 0.0001 (Student's t-Test). Größenbalken 10 µm

Ablauf der PFO-induzierten PVM-Ruptur festgehalten werden. Hierzu wurden HepG2-Zellen mit PbPFO_{LS}-Sporozoiten infiziert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion alle intakten Parasiten gezählt (Abb. 3.7). Parasiten, die bereits GFP ins Wirtszellzytosol abgegeben hatten, wurden nicht gezählt.

Während die Anzahl der intakten Kontrollparasiten im Laufe des Experiments relativ konstant blieb, konnte bei den PbPFO_{LS}-Parasiten bereits 30 hpi eine signifikante Reduktion intakter Parasiten festgestellt werden. Der Anteil intakter Parasiten betrug zu diesem Zeitpunkt nur noch etwa 60 % des Ausgangswertes. 40 h nach Infektion war

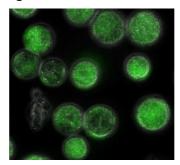
der Anteil intakter PbPFO_{LS}-Parasiten auf ca. 15 % gesunken. Eine Quantifizierung zu einem noch späteren Zeitpunkt (48 hpi) wurde nicht mehr durchgeführt, da aufgrund der schwachen GFP-Fluoreszenz vieler Zellen eine eindeutige Unterscheidung zwischen intakten und nicht-intakten Zellen nicht mehr möglich war. Vereinzelt waren 48 hpi allerdings noch intakte Parasiten zu erkennen.

Da die für die PFO-Expression verwendete leberphasenspezifische Promotorregion ab ungefähr 24 hpi aktiv ist (Helm et al., 2010) führen diese Ergebnisse zu dem Schluss, dass PFO bereits relativ kurz nach Beginn der Expression und somit vermutlich bereits in geringer Konzentration einen erheblichen Einfluss auf die Parasiten hat. Gleichwohl waren bei 40 hpi immer noch intakte Parasiten vorhanden, was darauf hindeutet, dass einige Parasiten in der Lage sind, der lytischen Wirkung von PFO für eine längere Zeit zu widerstehen. Gesetzt der Annahme, dass sich die PbPFO_{LS}-Parasiten bis zum Zeitpunkt ihrer PVM-Ruptur normal entwickeln, hätten dementsprechend in diesem Experiment ungefähr 15 % der zu Beginn gezählten Parasiten bis 40 hpi eine normale Entwicklung durchlaufen. Falls sich die transgenen Parasiten *in vivo* ähnlich verhalten, könnten somit einige dieser Parasiten als potentielle Quelle von Proteinen/Antigenen der späten Leberphase fungieren.

Da bereits ein einzelner Merozoit ausreichend ist, um eine Blutphase zu etablieren, ist es für die Entwicklung genetisch attenuierter Parasiten als Lebendimpfstoff essentiell, dass kein Parasit die Leberphase beenden kann. Dementsprechend wurden die PbPFO_{LS}-Parasiten auch hinsichtlich einer erfolgreichen Beendigung der Leberphase analysiert. *P. berghei* Parasiten beenden die Leberphase *in vitro* durchschnittlich 65 hpi (Sturm et al., 2006). Ab diesem Zeitpunkt können Merosomen und abgelöste, merozoitengefüllte Zellen im Zellkulturüberstand beobachtet werden.

Bei den Versuchen beendeten 66 hpi durchschnittlich 13 % der Kontrollparasiten, bezogen auf die Anzahl infizierter Zellen 24 hpi, die Leberphase in Form von abgelösten Zellen. 72 hpi wurden weitere 3 % abgelöste Zellen gezählt. Bei den PbPFO_{LS}-Parasiten konnte hingegen nur eine abgelöste Zelle in einem von insgesamt sechs unabhängigen Experimenten beobachtet werden (Abb. 3.8).

Abgelöste Zellen / Merosomen



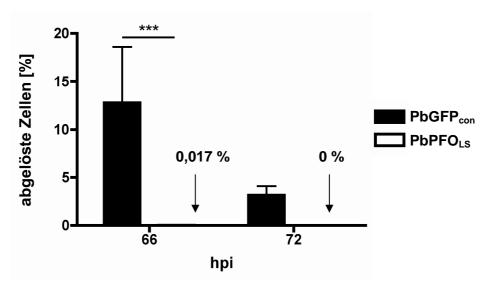


Abb. 3.8: PbPFO_{LS}-Parasiten attenuieren in der Leberphase

HepG2-Zellen wurden in den Vertiefungen einer 24-well Zellkulturschale mit PbGFP_{con} – bzw. mit PbPFO_{LS}-Sporozoiten infiziert. Zur Bestimmung des Ausgangswertes wurden 24 hpi fluoreszenzmikroskopisch alle intakten Parasiten gezählt. 66 hpi und 72 hpi wurden die Zellkulturüberstände, die abgelöste Zellen und Merosomen enthalten, jeweils in eine neue Vertiefung überführt und zum Anfärben der DNA für 5 min mit Hoechst33342 inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden anschließend jeweils alle abgelösten Zellen gezählt. Diese enthielten Reste der Wirtszell-DNA und konnten so von Merosomen unterschieden werden. Das Bild zeigt eine typische Verteilung von Zellen in den Zellkulturüberständen.

Angegeben sind die Ergebnisse aus 5 (PbGFPcon) bzw. 6 (PbPFOLS) unabhängigen Experimenten in % +SD, bezogen auf die 24 hpi Werte. Die Anzahl der Parasiten, die 24 hpi gezählt wurden, wurde hierzu auf 100 % gesetzt.

 $f^{**} = 0,0004$ (Student's t-Test).

Damit bestätigten die in vitro Experimente die Attenuierung der PbPFO_{LS}-Parasiten. In nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die PbPFO_{LS}-Parasiten diesen attenuierten Phänotyp auch in vivo zeigen und keine Blutphase etablieren.

10 Balb/c und 10 C57BL/6 Mäuse erhielten eine i.v. Injektion mit jeweils 5.000 PbPFO_{LS}-Sporozoiten. Ab Tag 4 nach der Injektion (p.i., post injection) wurde die Parasitämie der Mäuse in Blutausstrichen kontrolliert. Bei zwei C57BL/6-Mäusen konnten ab Tag 7 p.i. Parasiten im Blutausstrich nachgewiesen werden. Alle anderen Mäuse entwickelten bis zum Ende des Versuchs (Tag 18 p.i.) keine Parasitämie (Tab. 3.1). Demnach können vereinzelt PbPFO_{LS}-Parasiten die Leberphase auch *in vivo* abschließen und eine Blutphase etablieren.

Tab. 3.1: Infektion von Balb/c- bzw. C57BL/6-Mäusen mit PbPFO_{LS}-Sporozoiten

Infektion mit PbPFO _{LS} -	Balb/c	C57BL/6
Sporozoiten:	positiv/total	positiv/total
5.000	0/10	2/10

(Einzelheiten siehe Text)

Aufgrund der Tatsache, dass der überwiegende Teil der Mäuse jedoch keine Parasitämie entwickelte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine Immunisierung von Mäusen mit den genetisch attenuierten PbPFO_{LS}-Parasiten eine Protektion gegenüber einer Infektion mit *P. berghei* Wildtypsporozoiten bewirkt. Die Mäuse erhielten insgesamt dreimal eine i.v. Injektion von jeweils 5.000 PbPFO_{LS}-Sporozoiten (Abb. 3.9). Um die Effizienz der Immunisierung zu vergleichen, wurde die gleiche Anzahl von Mäusen nach demselben Immunisierungsschema mit bestrahlten Sporozoiten immunisiert. Die Immunisierung mit RAS stellt bis heute den "Goldstandard" bei Immunisierungen gegen Plasmodien dar (Butler et al., 2011; Vaughan et al., 2009b).

Alle Mäuse wurden während der Immunisierungsphase (*prime/boost*) kontinuierlich hinsichtlich der Entwicklung einer Parasitämie untersucht, da im ersten Experiment 2 Tiere positiv wurden. Erfreulicherweise entwickelte in Immunisierungs-Experiment jedoch keine der infizierten Mäuse eine Parasitämie, so dass das Experiment mit allen Tieren fortgeführt werden konnte.

14 Tage nach der letzten Immunisierung wurden alle immunisierten Mäuse sowie zusätzlich 6 naive Balb/c und 6 naive C57BL/6 Kontrollmäuse mit *P. berghei* Wildtypsporozoiten infiziert (*challenge*). Ab Tag 6 nach dem *challenge* wurde mit der Kontrolle der Parasitämie begonnen. Zu diesem Zeitpunkt konnten bei den 12 nicht immunisierten Kontrollmäusen bereits Parasiten im Blut nachgewiesen werden. Alle immunisierten Mäuse hingegen entwickelten bis zum Ende des Versuchs (Tag 18 nach *challenge*) keine Parasitämie (Abb. 3.9).



Immunisierung mit:	Balb/c positiv/total	C57BL/6 positiv/total
3 x 5.000 RAS	0/7	0/7
3 x 5.000 GAP	0/7	0/7
Naiv	6/6	6/6

Abb. 3.9: Challenge von immunisierten Balb/c- bzw. C57BL/6-Mäusen

Zur Immunisierung erhielten Balb/c und C57BL/6 Mäuse dem Schema folgend, jeweils dreimal eine i.v. Injektion mit attenuierten *P. berghei* Parasiten. 14 Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte der *challenge* der Mäuse mit jeweils 5.000 virulenten Wildtypsporozoiten. Bei allen Kontrollmäusen (naiv, nicht immunisiert) waren bereits an Tag 6 nach dem *challenge P. berghei* Parasiten im Blut nachweisbar. Alle immunisierten Mäuse blieben bis zum Versuchsende (Tag 18) im Blutausstrich negativ (siehe Tabelle).

RAS: bestrahlte Sporozoiten; GAP: PbPFO_{LS}-Parasiten

Somit konnten im ersten Teil dieser Arbeit erfolgreich genetisch attenuierte *P. berghei* Parasiten mittels leberphasenspezifischer Expression von PFO hergestellt werden. Die hergestellten PbPFO_{LS}-Parasiten zeigten den angestrebten attenuierten Phänotyp. Allerdings konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einige wenige Parasiten die Attenuierung durchbrechen und die Leberphase komplett durchlaufen. *In vivo* führte dies zur Entwicklung der pathogenen Blutphase. Weiterhin konnten Balb/c und C57BL/6 Mäuse durch eine Immunisierung mit PbPFO_{LS}-Parasiten steril vor einer Infektion mit *P. berghei* Wildtypparasiten geschützt werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten doppelt attenuierte Parasiten hergestellt werden, um breakthrough Infektionen zu verhindern. Zu diesem Zweck sollte die PFO-Expression mit der Deletion eines essentiellen Parasitengens kombinert werden. Wichtigstes Kriterium war dabei, dass die Parasiten ebenfalls eine Attenuierung in der späten Leberphase aufweisen sollten. Durch die Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe am BNI mit dem Labor von David Fidock an der Columbia University in New York konnte gezeigt werden, dass Parasiten, die Enzyme der Fettsäuresynthese nicht mehr herstellen konnten den gewünschten Phänotyp zeigten (Yu et al., 2008).

Ähnliche Arbeiten am Nagerpathogen P. yoelii bestätigten diese Ergebnisse weitgehend (Pei et al., 2010; Vaughan et al., 2009a). Für die vorliegende Arbeit wurde schließlich eine Deletion des Pyruvat Dehydrognase $E1\alpha$ (pdh- $e1\alpha$) Gens angestrebt, weil der Phänotyp der Pypdh- $e1\alpha$ -Parasiten (Pei et al., 2010) dem der PbPFO_{LS}-Parasiten am nächsten kam.

Bevor die Ergebnisse der Herstellung und Charakterisierung der doppelt attenuierten Parasiten vorgestellt werden, folgt im nächsten Abschnitt zunächst die Schilderung der Ergebnisse der Herstellung und Charakterisierung von Parasiten, die ausschließlich die Deletion des *pdh-e1*α-Gens Gens aufweisen. Die Kenntnis dieser Ergebnisse ist für das Verständnis der weiteren Arbeit wichtig.

3.2 Attenuierung von *P. berghei* Leberstadien durch Deletion des pdh-e1 α -Gens

Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Genen, die für die einzelnen Untereinheiten des Pyruvatdehydrogenase- (PDH) Enzymkomplex kodieren (pdh- $e1\alpha$, pdh-e3), zu einer vollständigen Attenuierung von P. yoelii Parasiten in der späten Schizogonie der Leberphase führt. Die Gendeletion hat keinen Einfluss auf andere Entwicklungsstadien der Parasiten, verhindert jedoch die Bildung exoerythrozytärer Merozoiten (Pei et al., 2010). Dieser beobachtete Phänotyp erschien exzellent für die in dieser Arbeit angestrebte Herstellung doppelt attenuierter P. berghei Parasiten geeignet zu sein.

Zunächst sollte die einfache Deletion des *P. berghei pdh-e1α*-Gens charakterisiert werden, da durch andere Studien bereits bekannt war, dass sich *P. berghei* und *P. yoelii* bei einer Deletion von Genen der Fettsäuresynthesemaschinerie nicht vollständig gleich verhalten (Vaughan et al., 2009a; Vaughan et al., 2009b; Yu et al., 2008).

Mittels Datenbankanalyse (GeneDB) wurde das P. berghei Homolog zum P. yoelii pdhe 1α -Gen ermittelt. Dieses war in der GeneDB als putative $E1\alpha$ -Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase annotiert (PBANKA_092380). Der Vergleich der PbPDH- $E1\alpha$ -und PyPDH- $E1\alpha$ -Aminosäure-Sequenzen machte deutlich, dass die PDH- $E1\alpha$ -Proteine der beiden Plasmodium-Spezies, bis auf einen Bereich im N-Terminus, ein hohes Maß an Sequenzidentität bzw. -ähnlichkeit aufweisen (Abb. 3.10).

РЬРDН РуРDН	MVFNTLYFLFFTFLLIKKCMSLNIKTNKNKSMVVNFISGCNYNNLFTBENTRAHDTSYKFMNLDLKTNKNKQIVVSFISGCNYNNLYNRENK *.*::******::*******:**.	60 32
PbPDH PyPDH	ENLKIKTKKKNIGNRKTLNSIKNTESNSSKNGNPFEQFNSENIVKQPIINNVDIDEKYDK KSLKIAKDDTKINSLKNDKYSEHVNIDEKYDK :.***:*. *:*****	
PbPDH PyPDH	NNYINKLYENEFYNSTNYNVYIENNKLGKYISDVSISQNEICTLYEDMNLGRLFENLVAK NDYINKLYENEFYDSTNYNVYIENNKLAEYISDVSINKNEICTLYEDMNLGRLFENLVAK *:*******:***************************	
PbPDH PyPDH	LYYNKKISGPVHLYNGQEAISTGIIKNLRNSDFVVSTYRDHVHAISKNVPIKEILNELYG LYYNKKINGFVHLYNGQEAISTGIIKNLRNSDFVVSTYRDHVHAISKNVPVKEILNELYG *******:*****************************	
PbPDH PyPDH	NYYGSTNHGKGGSMHIYSKKNNFIGGFGFIGEQIPISVGLAYSILYKKEFIQDISNQEYQ NYYGSTNQGKGGSMHIYNKKNNFIGGFGFIGEQIPISVGLAYSVLYKKEFIQDTSNKEYE ******:*****************************	300 244
PbPDH PyPDH	TPLEIKNTLINTINNIKENSIKNNDNQIEQKDENDLDVVVCPLGDGTSNIGQFYESLNLA TCSEKQNTLMNHVNDVKENLTKHDENEHD-KNENDLDVVVCPLGDGTSNIGQFFESLNLA * * :***: * :*::*: : *:***************	
PbPDH PyPDH	STYNLPIVPVIENNNWAIGMEGSRSSLGDLTNNYNKGQSPNITTYKVDGNDVLSIYKLAK STYNLPIIPVIENNNWAIGMESSRSSLGDLTNNYNKGKAPNITTYKVDGNDVLSIYKLAK ******::*****************************	
PbPDH PyPDH	KKINEIRKKKSGPILIEAITYRTRGHSLADPDLLRRLDEKTSWKKIDPIIQLTNYMKNNN KKINEIRKKKSGPILIEAITYRTRGHSLADPDLLRRLDEKTSWKKIDPIIQLTNYMKNNN **********************************	
PbPDH PyPDH	IVDSIYFENTKKEIQKMLLDAQNDADSNFEKSKNIDVCKLYDNNVFAPSEITKYQTSYSK IVDSIYFENTKKEIQKILLDAQNDADSNFEKSKNIDVCKLYDNNIFAPSEITKYQPSYSK ***********************************	
РЬРДН РуРДН	YKKYDQLSPNELAQYYQSYMNEINENPIKNEKNYYSKVFDKKELPLIIN 589 YKKYDQLSPNELIQYYQSYMNEINGKPIKNDKNYYSQIFDKKQLPLIIN 532	

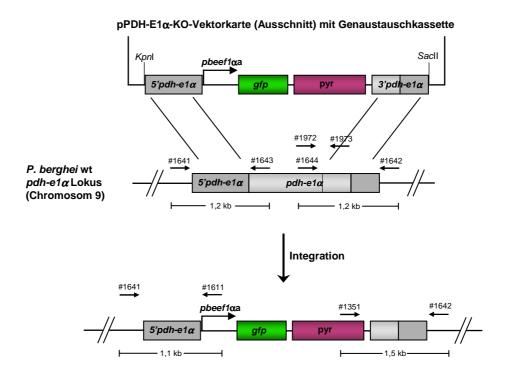
Abb. 3.10: *Alignment* der *P. berghei* und *P. yoelii* PDH-E1α-Aminosäure-Sequenzen Die Sequenzen wurden der GeneDB-Datenbank entnommen:

PbPDH-E1α: PBANKA_092380; PyPDH-E1α: PY00819. Das *Alignment* wurde mit Hilfe des Programms ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) erstellt. Identische Aminosäuren sind mit einem "*" gekennzeichnet, ähnliche Aminosäuren mit einem ":".

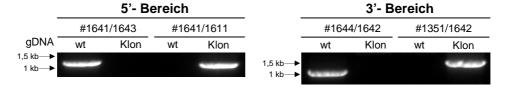
Zur Herstellung transgener P. berghei Deletionsmutanten (Pbpdhe1 α) wurde der pPDH-E1 α -KO-Vektor verwendet (siehe 2.2.16.4 und Abb. 3.11A). In den mit linearisierter pPDH-E1 α -KO-Vektor-DNA transfizierten Parasiten erfolgte eine Austauschmutagenese des pdh-e1 α -Gens über Doppel-crossover gegen ein insert, das eine Kassette zur konstitutiven GFP-Expression sowie eine Pyrimethaminresistenzkassette enthielt. Das Pbpdh-e1 α -Gen wurde dabei bis auf einen C-terminalen Rest (474 bp) deletiert.

Auch von den Pbpdhe 1α -Parasiten wurde durch *limiting dilution* eine klonale Linie hergestellt, die anschließend mittels Integrations-PCR verifiziert wurde. Die

A Integrationsschema



B Integrations-PCR



C RT-PCR

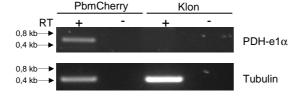


Abb. 3.11: Herstellung der Pbpdhe1α Knockout Parasiten

A) Das Genaustauschkonstrukt (bestehend aus den flankierenden 5' und 3'-Sequenzen, einer Pyrimethaminresistenzkassette und einer Kassette zur konstitutiven Expression von GFP) wurde durch Restriktion mit Kpnl und Sacll aus dem pPDH-E1 α -KO-Vektor ausgeschnitten und anschließend in P. berghei Parasiten transfiziert. Über homologe Rekombination integrierte das Genaustauschkonstrukt in den Pbpdh-e1 α -Lokus. Dabei wurde der pdh-e1 α -orf fast vollständig deletiert. Die 3'dhfr/ts-Bereiche sind der Übersichtlichkeit halber in dieser Darstellung nicht mit abgebildet.

Fortsetzung nächste Seite

Abb. 3.11: Herstellung der Pbpdhe1α Knockout Parasiten Fortsetzung

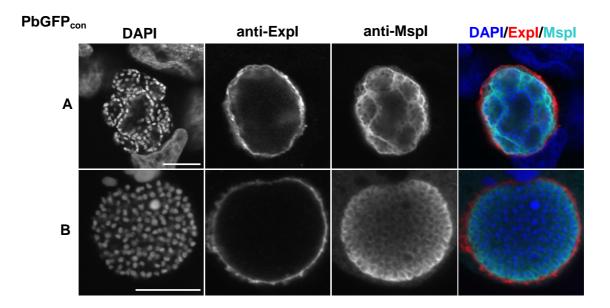
- **B)** gDNA aus Wildtyp- bzw. aus subklonierten Pbpdhe 1α -Parasiten (Klon) wurde für eine Integrations-PCR mit spezifischen Oligonukleotid-*primern*-Kombinationen eingesetzt:
- #1641/#1643 und #1642/#1644: Wildtypkontrolle (spezifisch für pdh-e1 α -Lokus).
- #1641/#1611 und #1351/#1642: Integrationskontrolle (spezifisch für eine erfolgreiche Integration des Genaustauschkonstrukts). Die erwarteten Produktgrößen sowie die Oligonukleotid-*primer*-Bindungsstellen sind in A) eingezeichnet.
- **C)** HepG2-Zellen wurden mit Kontroll- (PbmCherry) bzw. mit Pbpdhe1α-Sporozoiten infiziert. 48 hpi wurde die Gesamt-RNA der infizierten Zellen isoliert und für eine RT-PCR-Analyse eingesetzt. Zur Kontrolle der cDNA wurde eine RT-PCR mit PbTubulin spezifischen Oligonukleotid-*primern* (#1344/#1345) durchgeführt. Der Nachweis von *pdh-e1α*-cDNA erfolgte mittels der *pdh-e1α*-orf-spezifischen Oligonukleotid-*primer*-Kombination #1972/#1973. Zur Kontrolle von Verunreinigung durch genomische DNA wurden parallel PCR Ansätze ohne reverse Transkriptase (-RT) durchgeführt.

Verwendung von integrationsspezifischen Oligonukleotid-*primer*-Kombinationen (#1641/#1611; #1351/#1642) führte erwartungsgemäß nur bei gDNA der klonalen Pbpdhe 1α -Parasitenlinie zur Bildung von PCR-Produkten. Eine Kontamination der klonalen Linie mit Wildtypparasiten konnte hierbei durch die Verwendung *pdh-e1* α -Lokus-spezifischer Oligonukleotid-*primer*-Kombinationen (#1641/#1643; #1642/#1644) ausgeschlossen werden (Abb. 3.11B).

Weiterhin wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt, um zu zeigen, dass tatsächlich keine pdh- $e1\alpha$ -Transkripte mehr produziert werden (Abb. 3.11C). Hierfür wurden Oligonukleotid-primer (#1972/#1973) eingesetzt, die die Amplifikation eines 496 bp Abschnitts des Pbpdh- $e1\alpha$ -orf ermöglichten. Die Bildung eines PCR-Produkts der erwarteten Größe wurde erwartungsgemäß nur bei cDNA aus Kontrollparasiten beobachtet. Die zur Kontrolle der cDNA durchgeführte RT-PCR mit PbTubulinspezifischen Oligonukleotid-primern führte hingegen sowohl bei cDNA aus den Kontrollparasiten als auch bei cDNA aus den klonalen Pbpdhe 1α -Parasiten zur Bildung eines PCR-Produkts der erwarteten Größe. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass das pdh- $e1\alpha$ -Gen in den hergestellten Parasiten erfolgreich deletiert wurde, und dass die Parasiten kein pdh- $e1\alpha$ -Transkript mehr bildeten.

Im Anschluss an die PCR-Analysen wurde die Morphologie der Pbpdhe 1α -Parasiten per Immunfluoreszenzanalyse analysiert, um zu untersuchen, ob die Parasitenentwicklung in der Leberphase durch die *pdh-e1* α -Gendeletion beeinträchtigt wird. Dabei konnten hinsichtlich der Entwicklung in der frühen Leberphase keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollparasiten beobachtet werden. Die Pbpdhe 1α -Parasiten entwickelten sich bis hin zur Bildung von Merozoiten. Dieses konnte durch die Färbung mit Antikörpern gegen das Merozoitenoberflächenmolekül

Zytomerstadium / Merozoitenbildung



Pbpdhe1a

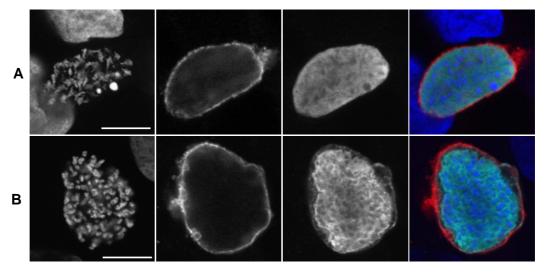


Abb. 3.12 Pbpdhe1α-Parasiten exprimieren Mspl

HepG2-Zellen wurden mit PbGFP $_{con}$ - bzw. Pbpdhe1 α -Sporozoiten infiziert und 65 hpi bzw. 72 hpi fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-Expl- (Huhn) und Anti-Mspl-Antikörpern (Maus) inkubiert. Die Färbung erfolgte im nächsten Schritt durch Inkubation mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Huhn-Alexa Fluor $^{@}$ 594 (Rot), Anti-Maus-Cy5 (Cyan) sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (Blau).

Konfokokale Aufnahmen; Größenbalken: 10 µm

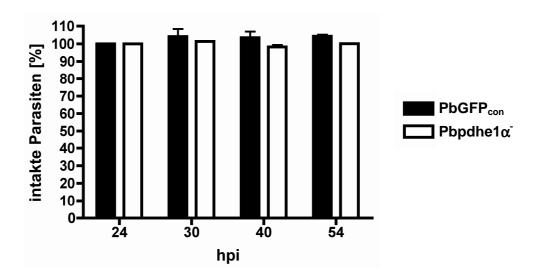
Mspl gezeigt werden (Abb. 3.12). Mspl war in Kontrollparasiten ab dem Zytomerstadium in der sich einschnürenden Membran des Parasiten zu beobachten (Abb. 3.12; PbGFP_{con}, A). Zu einem späteren Zeitpunkt war jeder einzelne Merozoit mit einer Mspl-positiven Parasitenmembran umgeben (Abb. 3.12; PbGFP_{con}, B). Überraschenderweise konnte eine ähnliche Verteilung des Mspl auch bei sehr späten (72 hpi) Pbpdhe1 α -Parasiten beobachtet werden (Abb. 3.12; Pbpdhe1 α -, B). Bei

einigen Pbpdhe1 α -Parasiten war hingegen eine nahezu homogene Verteilung von Mspl im Parasitenzytosol zu beobachten (Abb. 3.12; Pbpdhe1 α , A). Die Mspl-Färbung in Pbpdh-e1 α -Parasiten war deswegen unerwartet, weil in *P. yoelii pdh-e1\alpha* Parasiten keine Mspl beobachtet werden konnte (Pei et al., 2010).

Wie bei den PbPFO_{LS}-Parasiten sollte auch für die Pbpdh-e1 α -Parasiten quantifiziert werden, ob sich die Anzahl intakter Parasiten während der Entwicklung in der Leberphase *in vitro* ändert, um aussagen zu können, ob und ab wann die Gendeletion einen Einfluss auf die Parasitenentwicklung hat. Ein Unterschied zu den Kontrollparasiten und eine damit verbundene Abnahme der Anzahl intakter Parasiten konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 3.13A). Auch 54 hpi, einem späten Zeitpunkt in der Leberphasenentwicklung von *P. berghei*, war der Anteil von Kontrollund Pbpdhe1 α -Parasiten nahezu gleich. Die Deletion des *pdh-e1\alpha*-Gens führte demnach in *P. berghei* nicht zu einem frühzeitigen Tod der Parasiten in der Leberphase. Vielmehr waren einige Pbpdh-e1 α -Parasiten erkennbar in der Lage, sich über das Schizontenstadium hinaus zu entwickeln (Abb. 3.12).

Beim mikroskopischen Vergleich von Kontroll- und Pbpdhe 1α -Parasiten fiel in späten Stadien ein Größenunterschied auf. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurde in mehreren Experimenten die Größe von Kontroll- und Pbpdhe 1α -Parasiten 30 hpi und 54 hpi mit Hilfe der Openlab-Software vermessen (mit dem Modul *density slicing*). Während 30 h nach Infektion zwischen beiden Parasitenlinien noch kein Unterschied feststellbar war (Abb. 3.13B), konnte 54 h nach Infektion jedoch ein signifikanter Größenunterschied ermittelt werden. Die Pbpdhe 1α -Parasiten waren in dem Zeitraum von 30 bis 54 hpi zwar deutlich gewachsen (durchschnittliche Größe ca. 200 µm²), jedoch waren sie in etwa um ein Drittel kleiner als die Kontrollparasiten (durchschnittliche Größe ca. 300 µm²). Die Deletion des pdh- $e1\alpha$ -Gens ist demzufolge für die Parasiten bis in die sehr späte Leberphase hinein zwar nicht letal, führt aber zu einem verzögerten und verminderten Wachstum.

A Quantifizierung intakter P. berghei Leberstadien



B Vergleich der Parasitengröße

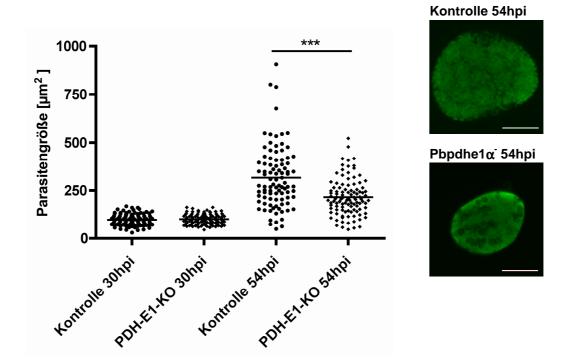


Abb. 3.13 Quantifizierung intakter *P. berghei* Parasiten und Messung der Parasitengröße zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion

A) Wie bereits in Abb. 3.7 beschrieben, wurde 24 hpi, 30 hpi, 40 hpi und 54 hpi die Anzahl intakter Kontroll- bzw. Pbpdhe1α-Parasiten ermittelt. Angegeben sind die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten in % +SD bezogen auf die 24 hpi Werte. Die Anzahl der Parasiten, die 24 hpi gezählt wurden, wurde hierzu auf 100 % gesetzt. Fortsetzung nächste Seite

Abb. 3.13 Quantifizierung intakter *P. berghei* Parasiten und Messung der Parasitengröße zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion

Fortsetzung

B) HepG2-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. Pbpdhe 1α -Parasiten infiziert. Als Kontrolle dienten hier PbGFP_{con} und PbmCherry-Parasiten. 30 hpi und 54 hpi wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie Bilder der Parasiten gemacht (s.o.). Anhand der Bilder konnte anschließend mit Hilfe der Openlab Software (Funktion *density sclicing*) die Größe der Parasiten vermessen werden. Angegeben sind die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten. ***: P = <0,0001 (Student's t-Test); Größenbalken: 10 µm

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Pbpdhe 1α -Parasiten die Leberphase erfolgreich beenden können. Dazu wurde die Anzahl abgelöster Zellen am Ende der Leberphase bestimmt. Während sich bei den Kontrollparasiten etwa 15 % der infizierten Zellen ablösten, waren bei den Pbpdhe 1α -Parasiten nur vereinzelt abgelöste Zellen zu sehen (Abb. 3.14). Auffällig hierbei war, dass vorzugsweise erst 72 hpi abgelöste, Pbpdhe 1α -infizierte Zellen zu finden waren. Diese Daten zeigen, dass Pbpdhe 1α -Parasiten tatsächlich attenuiert sind. Anhand der Ergebnisse wird allerdings auch deutlich, dass diese Attenuierung durchbrochen werden kann.

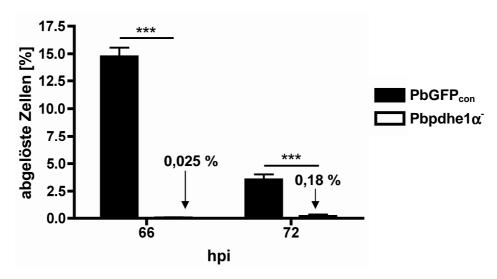


Abb. 3.14: Einige Pbpdhe1α-Parasiten können die Leberphase beenden

Analog zu der bereits in Abb. 3.8 beschriebenen Vorgehensweise wurde die Anzahl abgelöster Zellen von Kontroll- und Pbpdhe 1α -Parasiten 66 hpi und 72 hpi ermittelt.

Angegeben sind die Ergebnisse aus 3 (PbGFP $_{con}$) bzw. 4 (Pbpdhe1 α) unabhängigen Experimenten in % +SD bezogen auf die 24 hpi Werte. Die Anzahl der Parasiten, die 24 hpi gezählt wurden, wurde hierzu auf 100 % gesetzt.

*** = < 0,0001 (Student's t-Test).

Zur Kontrolle, ob Pbpdhe1 α -Parasiten *in vivo* eine Blutphase etablieren können, wurden zunächst nur einer NMRI-Maus 7.500 Pbpdhe1 α -Sporozoiten i.v. injiziert. Bei einer Analyse an Tag 7 p.i. ließen sich *P. berghei* Parasiten im Blut nachweisen, weswegen auf weitere Tierexperimente verzichtet werden konnte. Hieraus wurde geschlossen, dass die Deletion des *pdh-e1\alpha*-Gens im Gegensatz zu *P. yoelii* (Pei et al., 2010) in *P. berghei* tatsächlich nicht ausreicht, um eine vollständige Attenuierung der Parasiten in der Leberphase zu erreichen. Trotzdem eigneten sich diese teilattenuierten Parasiten sehr gut für den im Rahmen dieser Arbeit verfolgten Ansatz doppelt attenuierte Parasiten herzustellen, da damit überprüft werden konnte, ob diese doppelte genetische Manipulation die Entwicklung zur Blutphase komplett verhindert.

3.3 Herstellung und Charakterisierung doppelt attenuierter P. berghei Parasiten

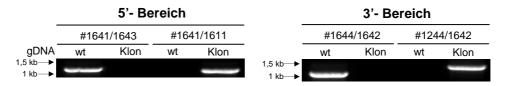
Die bei den zuvor hergestellten PbPFO_{LS}-, und Pbpdhe 1α -Parasiten beobachteten breakthrough Infektionen bestätigen die Vermutung, dass eine einzelne Attenuierung nicht sicher genug ist, um die Entstehung einer Blutinfektion vollständig zu verhindern. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit sichere doppelt attenuierte Parasiten hergestellt werden.

Hierzu wurde der pPDH-E1α-KO_PFO_{LS}-Vektor verwendet (siehe 2.2.16.5 und Abb. 3.15A). Dieser enthielt jeweils eine Expressionskassette zur leberphasenspezifischen Expression von PFO::V5-Proteinen und zur konstitutiven Expression von GFP. Nach der Transfektion der linearisierten Vektor-DNA in *P. berghei* Wildtypparasiten erfolgte in diesen eine stabile Integration des Genaustauschkonstrukts mittels Doppel-crossover in den Pbpdh-e1α-Lokus. Bei diesem Schritt wurde das Pbpdh-e1α-Gen, wie bereits bei den Pbpdhe1α-Parasiten, bis auf einen C-terminalen Rest von 474 bp deletiert. Analog zur Vorgehensweise bei den PbPFO_{LS}- und Pbpdhe1α-Parasiten wurde auch von den neuen transgenen Parasiten durch *limiting dilution* eine klonale Parasitenlinie hergestellt (Pbpdhko-PFO_{LS}). Der daraus hervorgegangene Klon wurde über eine Integrations-PCR verifiziert (Abb. 3.15B). PCR-Produkte in der erwarteten Größe wurden bei der Verwendung von integrationsspezifischen Oligonukleotid-*primer*-Kombinationen (#1641/#1611; #1244/#1642) erwartungsgemäß nur bei gDNA der klonalen Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasitenlinie erhalten. Zudem konnte eine Kontamination der klonalen Linie mit Wildtypparasiten unter Verwendung *pdh-e1α*-Lokus-

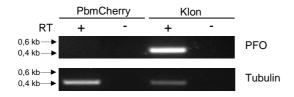
A Integrationsschema

pPDH-E1 α -KO-PFO_{LS}-Vektorkarte (Ausschnitt) mit Genaustauschkassette SacII Kpnl pbeef1αa pbprLS 5'pdh-e1α 3'pdh-e1α #1641 #1643 #1642 #1644 P. berghei wt 5'pdh-e1α pdh-e1α Lokus pdh-e1a (Chromosom 9) Integration #1641 #1611 pbeef1αa pbpr_{LS} #1244 5'pdh-e1α 1,4 kb

B Integrations-PCR



C RT-PCR (pfo)



D RT-PCR ($pdh-e1\alpha$)

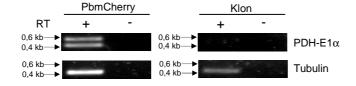


Abb. 3.15: Herstellung von Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten

Legende nächste Seite

Abb. 3.15: Herstellung von Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten

A) Schematische Darstellung: Analog zu Abb. 3.11 integrierte das Genaustauschkonstrukt nach der Transfektion über homologe Rekombination in den Pbpdh-e1α-Lokus. Dabei wurde der pdh-e1α-orf fast vollständig deletiert und gleichzeitig eine PFO::V5- und eine GFP-Expressionskassette sowie eine Pyrimethaminresistenzkassette eingefügt. Die transgenen Parasiten exprimieren somit konstitutiv GFP sowie leberphasenspezifisch PFO::V5. Die 3'dhfr/ts-Bereiche sind der Übersichtlichkeit halber in dieser Darstellung nicht abgebildet.

 $\textbf{B)} \ \text{gDNA} \ \text{aus Wildtyp-bzw. aus subklonierten Pbpdhko-PFO}_{LS}\text{-Parasiten (Klon)} \ \text{wurde für eine Integrations-PCR mit spezifischen Oligonukleotid-} \\ primern\text{-Kombinationen eingesetzt:}$

#1641/#1643 und #1642/#1644: Wildtypkontrolle (spezifisch für *pdh-e1α*-Lokus),

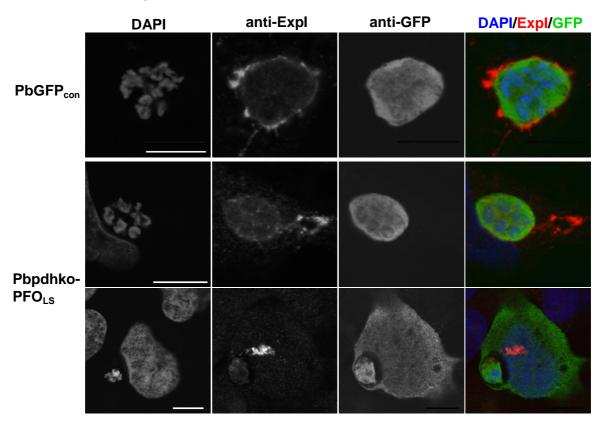
#1641/#1611 und #1244/#1642: Integrationskontrolle (spezifisch für eine erfolgreiche Integration des Genaustauschkonstrukts). Die erwarteten Produktgrößen sowie die Oligonukleotid-*primer*-Bindungsstellen sind in A) eingezeichnet.

C+D) HepG2-Zellen wurden mit Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten bzw. mit Kontrollsporozoiten (PbmCherry) infiziert. 30 hpi wurde die Gesamt-RNA der infizierten Zellen isoliert und für eine RT-PCR-Analyse eingesetzt. Zur Kontrolle der cDNA wurde eine RT-PCR mit PbTubulin spezifischen Oligonukleotid-*primern* (#1344/#1345) durchgeführt. Weiterhin wurden zur Kontrolle von Verunreinigung durch genomische DNA parallel PCR-Ansätze ohne reverse Transkriptase (-RT) durchgeführt. Die Nachweise von *pfo*-cDNA bzw. *pdh-e1\alpha*-cDNA erfolgten unter Verwendung der Oligonukleotid-*primer* #1938/#1939 (C) bzw. #1972/#1973 (D).

spezifischer Oligonukleotid-*primer*-Kombinationen (#1641/#1643; #1642/#1644) ausgeschlossen werden.

Im Anschluss wurde mittels RT-PCR analysiert, ob die klonalen Parasiten in der Leberphase pfo::V5-, aber kein pdh-e1a-Transkript mehr bilden (Abb. 3.15C und 3.15D). Die RT-PCR erfolgte anhand von RNA, die 30 h nach Infektion aus Pbpdhko-PFO_{LS}-infizierten HepG2-Zellen isoliert wurde. Die Verwendung der pfo-spezifischen Oligonukleotid-primer (#1938/#1939) ermöglichte bei cDNA aus Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten die Bildung eines PCR-Produkts der erwarteten Größe (428 bp) (Abb. 3.15C; Klon, +RT). Im Gegensatz hierzu konnte, bei der Verwendung Pbpdh-e1 α -orfspezifischer Oligonukleotid-primer (#1972/#1973), die Bildung eines PCR-Produkts der erwarteten Größe (496 bp) nur bei der Verwendung von cDNA aus Kontrollparasiten (PbmCherry) beobachtet werden (Abb. 3.15D). Überaschenderweise kam es hier zusätzlich zur Bildung eines weiteren PCR-Produkts, das bei der Verwendung von 48 hpi-cDNA nicht beobachtet wurde. Da es bei cDNA aus Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten jedoch nicht zur Bildung eines PCR-Produkts kam, wurde das bei den Kontrollparasiten beobachtete Phänomen zunächst nicht weiter analysiert. Die mit PbTubulinspezifischen Oligonukleotid-primern (#1344/#1345) durchgeführte Kontroll-PCR zur Überprüfung der cDNA-Qualität führte sowohl bei cDNA aus den Kontrollparasiten als auch bei cDNA aus den Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten zur Bildung eines PCR-Produkts der erwarteten Größe (Abb. 3.15C und 3.15D). Eine Kontamination der Proben mit gDNA konnte ausgeschlossen werden (Abb. 3.15C und 3.1.5D; -RT).

A Frühe Schizogonie



B Späte Schizogonie

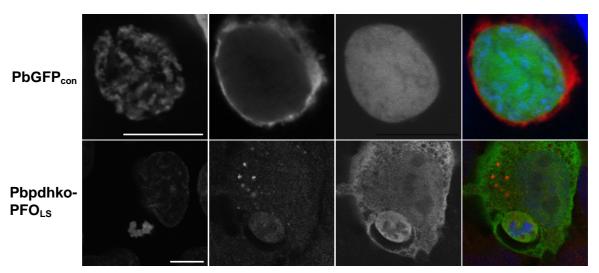


Abb. 3.16: Pbpdhko-PFO $_{LS}$ -Parasiten zeigen eine vergleichbare Entwicklung zu den PbPFO $_{LS}$ -Parasiten

HepG2-Zellen wurden mit PbGFP_{con}- bzw. Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten infiziert und 30 hpi (A) und 48 hpi (B) fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-Expl- (Huhn) und Anti-GFP-Antikörpern (Kaninchen) inkubiert. Darauf erfolgte die Färbung durch Inkubation mit den fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern Anti-Huhn-Alexa Fluor[®] 594 (Rot) und Anti-Kaninchen-Cy2 (Grün) sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (Blau). Zur besseren Kontrastierung sind die Einzelbilder in Graustufen dargestellt.

Konfokale Aufnahmen; Größenbalken: 10 µm.

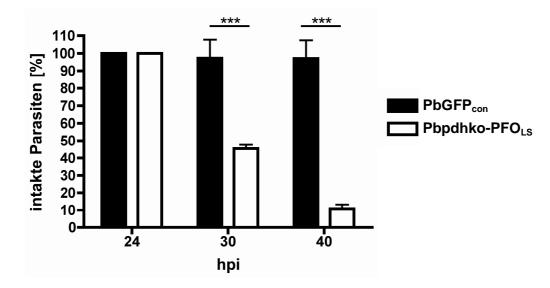
Damit war die Herstellung einer klonalen Linie doppelt attenuierter Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten gelungen. Vor der Durchführung von Infektionsexperimenten sollten die Parasiten zunächst charakterisiert werden.

Eine Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung der Morphologie der Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten zeigte, dass sich die Parasiten zu Schizonten entwickelten (Abb. 3.16). Die späten Pbpdhko-PFO_{LS}-Schizonten enthielten jedoch eine wesentlich geringe Anzahl an Parasitenzellkernen als die Kontrollparasiten. Sowohl 30 hpi als auch 48 hpi konnte GFP in den Wirtszellen nachgewiesen werden, die mit Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten infiziert waren. Das PVM-Markerprotein Expl wurde, vergleichbar mit den PbPFO_{LS}-Parasiten, nur noch in vereinzelten, nicht zusammenhängenden Agglomeraten innerhalb der Wirtszelle gefunden. Anzeichen für einen Zelltod der infizierten Wirtszellen nach der PVM-Ruptur der Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten waren auch hier nicht zu erkennen. Damit deckten sich die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen weitgehend mit den Ergebnissen, die bei IFA der PbPFO_{LS}-Parasiten erhalten wurden. Trotz der zusätzlichen Deletion des Pb*pdh-e1α*-Gens war die PFO-induzierte Ruptur der PVM nicht beeinträchtigt.

Das Auszählen intakter Parasiten zeigte allerdings, dass die doppelte Attenuierung einen stärkeren Effekt auf die Viabilität der Parasiten hatte als die einfache Attenuierung durch PFO-Expression. 30 hpi waren noch ca. 45 % intakte Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten vorhanden (Abb. 3.17A; vgl.: 60 % PbPFO_{LS}, Abb. 3.7). Dieser Anteil sank im Verlauf der darauf folgenden 10 Stunden auf nur noch ca. 10 % (vgl.: 15 % PbPFO_{LS}, Abb. 3.7). Somit unterschieden sich die beiden Parasitenlinien in der Anzahl intakter Parasiten 30 hpi um 15 %. Der Unterschied reduzierte sich jedoch bis 40 hpi auf nur noch 5 %.

Um zu überprüfen, ob die doppelte Attenuierung tatsächlich zu einem soliden Arrest der Parasiten in der Leberphase führt und somit die einzelnen Attenuierungen übertreffen kann, wurden die Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten analog zu den PbPFO_{LS}- und Pbpdhe1α-Parasiten *in vitro* hinsichtlich der Bildung von Merosomen und abgelösten Zellen untersucht. Während sich die Kontrollparasiten normal entwickelten, wurden bei den Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten in keinem Fall abgelöste Zellen oder Merosomen beobachtet (Abb. 3.17B). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten, unter *in vitro* Bedingungen, tatsächlich nicht mehr in der Lage waren, die Leberphase zu beenden. Somit war durch die Kombination von PFO-Expression

A Quantifizierung intakter P. berghei Leberstadien



B Quantifizierung abgelöster Zellen

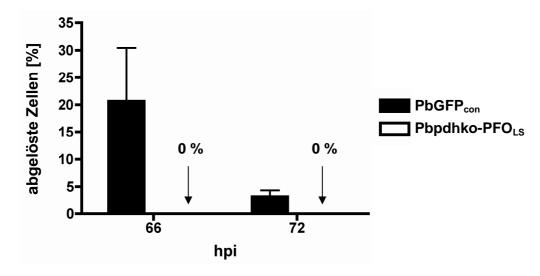


Abb. 3.17: Quantifizierung von Pbpdhko-PFO_{LS}-Leberstadien

A) Analog zu der in Abb. 3.7 beschriebenen Vorgehensweise wurde die Zahl intakter Kontrollund Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten 24 hpi, 30 hpi und 40 hpi ermittelt.

Angegeben sind die Ergebnisse in % +SD bezogen auf die 24 hpi-Werte. Die Anzahl der Parasiten, die 24 hpi gezählt wurden, wurde hierzu auf 100 % gesetzt. Angegeben sind die Ergebnisse aus 4 (PbGFP $_{con}$) bzw. 3 (Pbpdhko-PFO $_{LS}$) unabhängigen Experimenten. ***: P < 0,0005 (Student's t-Test).

B) Wie in Abb. 3.8 bereits beschrieben wurde die Zahl abgelöster Zellen 66 hpi und 72 hpi ermittelt. Angegeben sind die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten in % +SD bezogen auf die 24 hpi-Werte. Die Anzahl der Parasiten, die 24 hpi gezählt wurden, wurde hierzu auf 100 % gesetzt.

und *pdh-e1α*-Deletion der Grad der Attenuierung deutlich höher als bei den einfach attenuierten Parasiten. Nach diesem vielversprechenden Ergebnis sollte die Attenuierung dieser transgenen Parasiten nun auch *in vivo* überprüft werden.

Zunächst wurde untersucht, ob die doppelte Attenuierung die Parasiten vollständig an der Etablierung einer Blutphase hindern kann. Dazu wurden 10 der für *P. berghei* empfänglicheren C57BL/6 Mäuse (Scheller et al., 1994) mit jeweils 5.000 Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten i.v. infiziert. Bis Tag 25 nach Injektion konnten im Blutausstrich keine Parasiten nachgewiesen werden (Tab. 3.2). In einem weiteren Experiment wurde einer neuen, kleineren Gruppe von C57BL/6 Mäusen eine wesentlich höhere Dosis von Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten injiziert. Drei C57BL/6 Mäuse erhielten eine Injektion von jeweils 25.000 Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten. Auch bei diesen Mäusen konnten bis zum Ende des Experiments (Tag 18) keine Parasiten im Blutausstrich nachgewiesen werden (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Infektion von C57BL/6-Mäusen mit Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten

Infektion mit Pbpdhko-PFO _{LS} - Sporozoiten:	C57BL/6 positiv/total
5.000	0/10
25.000	0/3

(Einzelheiten siehe Text)

Als nächstes wurde getestet, ob die Immunisierung mit Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten Mäuse vor einer Infektion mit voll-virulenten *P. berghei* Wildtypparasiten schützt. Hierfür wurden die 10 C57BL/6 Mäuse verwendet, die bereits im vorherigen Experiment eine Injektion mit jeweils 5.000 Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten erhalten hatten (s.o.). An Tag 25 p.i. und Tag 50 p.i erhielten sie neue Injektionen mit jeweils 5.000 Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten (*boost* I und II, siehe Immunisierungsschema Abb. 3.18).

Auch nach diesen *boost*-Immunisierungen entwickelten die Mäuse keine Parasitämie. Der *challenge* mit jeweils 5.000 *P. berghei* Wildtypsporozoiten erfolgte in diesem Experiment 30 Tage nach der letzten Immunisierung. Zur Kontrolle wurden 7 naive C57BL/6 Mäuse ebenfalls mit jeweils 5.000 *P. berghei* Wildtypsporozoiten infiziert. Bei allen nicht immunisierten Kontrollmäusen konnten bereits 6 Tage nach Infektion Parasiten im Blut nachgewiesen werden. Dagegen entwickelte keine der immunisierten Mäuse bis zum Ende des Versuchs (Tag 18 nach *challenge*) eine Parasitämie (Abb. 3.18)



Immunisierung mit:	C57BL/6 positiv/total
3x 5.000 GAP	0/10
Naiv	7/7

Abb. 3.18: Challenge von immunisierten C57BL/6 Mäusen

Zur Immunisierung erhielten 10 C57BL/6 Mäuse dem Schema folgend jeweils dreimal eine i.v. Injektion mit doppelt attenuierten Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten. 30 Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte der *challenge* der Mäuse mit jeweils 5.000 Wildtypsporozoiten. Alle nicht immunisierten Kontrollmäuse (naiv) enthielten bereits an Tag 6 nach dem *challenge P. berghei* Parasiten im Blut. Alle immunisierten Mäuse hingegen blieben bis zum Versuchsende (Tag 18) im Blutausstrich negativ (siehe Tabelle).

Mit den doppelt attenuierten Parasiten konnten demnach sogar die für eine *Plasmodium* Infektion sehr empfänglichen C57BL/6 Mäuse steril gegen eine Infektion mit voll-virulenten *P. berghei* Wildtyp Parasiten geschützt werden. Erfreulicherweise konnte bei den Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten, im Gegensatz zu den einfach attenuierten PbPFO_{LS}- oder Pbpdhe1 α -Parasiten, jedoch kein Durchbrechen der Leberphase beobachtet werden.

4 Diskussion

Nach wie vor ist Malaria eine der bedeutendsten Tropenkrankheiten, an der jährlich fast 1 Mio. Menschen sterben (WHO, 2010b). Die Behandlung der Patienten wird durch die zunehmende Resistenz der Plasmodien gegen bestehende Malariamedikamente enorm erschwert. Für eine effiziente Bekämpfung der Malaria wird dementsprechend ein Impfstoff gegen die humanpathogenen Plasmodiumparasiten dringend benötigt. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist es bisher nicht gelungen, eine kommerziell erhältliche Malariavakzine herzustellen. Der bisher aussichtsreichste Impfstoffkandidat, die subunit Vakzine RTS,S/AS01E, befindet sich zurzeit in klinischen Phase III Studien. Jedoch vermittelt dieser Impfstoff leider keinen vollständigen Schutz vor einer Infektion mit den Malariaerregern (Aponte et al., 2007; Bejon et al., 2008; Cohen et al., 2010). Dass es prinzipiell möglich ist, eine sterile Protektion gegen Malaria zu vermitteln, konnte in verschiedenen Studien eindrucksvoll demonstriert werden. Hierbei wurden attenuierte Parasiten, welche sich nicht über das Leberstadium hinaus entwickeln können, als experimentelle Lebendimpfstoffe verwendet (Aly et al., 2008; Butler et al., 2011; Clyde, 1975; Douradinha et al., 2007; Falae et al., 2010; Friesen and Matuschewski, 2011; Labaied et al., 2007; Mueller et al., 2005a; Mueller et al., 2005b; Nussenzweig et al., 1967; Pei et al., 2010; van Dijk et al., 2005; van Schaijk et al., 2008; VanBuskirk et al., 2009; Vaughan et al., 2009a; Vaughan et al., 2009b; Yu et al., 2008). Doch die Herstellung attenuierter Plasmodiumparasiten als Lebendimpfstoff ist problematisch und birgt gewisse Risiken. Die Attenuierung von Sporozoiten durch Bestrahlung ist wirkungsvoll, aber es muss eine korrekte Strahlungsdosis, um vitale, aber nicht mehr teilungsfähige Parasiten zu erhalten, eingehalten werden (Friesen and Matuschewski, 2011; Suhrbier et al., 1990; Vanderberg et al., 1968).

Eine besser zu kontrollierende Alternative bietet die Attenuierung der Parasiten durch genetische Manipulation. Die Deletion eines essentiellen Gens führt dabei zu einem Entwicklungsarrest der Parasiten, so dass diese die Leberphase nicht mehr beenden können. Das vereinzelte Auftreten von breakthrough Infektionen nach der Deletion eines bestimmten essentiellen Gens macht jedoch deutlich, dass für die Herstellung einer sicheren Vakzine weitere Maßnahmen benötigt werden (Mueller et al., 2005a; Tarun et al., 2007; Vaughan et al., 2009a; Vaughan et al., 2009b; Yu et al., 2008). So bietet die mehrfache Attenuierung der Parasiten durch die Deletion von mindestens zwei essentiellen Parasitengenen eine größere Sicherheit (Jobe et al., 2007; Labaied et al., 2007; VanBuskirk et al., 2009). Allerdings gestaltet sich vor allem bei *P. falciparum* die Suche nach Genen, die für die Leberstadienentwicklung essentiell

sind, als schwierig, da bisher nur eingeschränkt aussagekräftige Modellsysteme für die Charakterisierung der *P. falciparum* Leberphase existieren und weiterhin ein Insektarium der Sicherheitsstufe 3 für die Kultivierung *P. falciparum*-infizierter Mücken bereitgehalten werden muss. Somit ist die Anzahl bisher charakterisierter *P. falciparum* Gene, die für eine doppelte Attenuierung verwendet werden können, sehr klein. Zudem kann eine Deletion mehrerer Gene zur Folge haben, dass die Parasiten schon früher attenuieren bzw. eine kürzere Persistenz aufweisen (VanBuskirk et al., 2009), was wiederum zu einem einem verminderten Impfschutz führen könnte.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neuer Ansatz zur Herstellung doppelt genetisch attenuierter Parasiten verfolgt. Ziel war die Attenuierung der Parasiten in der späten Schizogonie der Leberphase, weil Studien mit einfachattenuierten Parasiten bereits eindrucksvoll belegten, dass spät attenuierte Parasiten einen besseren Schutz vermitteln als früh attenuierte Parasiten.(Butler et al., 2011; Falae et al., 2010; Pei et al., 2010; Vaughan et al., 2009a; Vaughan et al., 2009b; Yu et al., 2008)

Attenuierungsversuche durch Expression potentiell toxisch wirkender Proteine

Die Attenuierung von Parasiten in der Leberphase durch eine stadienspezifische Expression potentieller Toxine bietet verschiedene Vorteile gegenüber der bisher durchgeführten Attenuierung der Parasiten durch die Deletion essentieller Gene. Zum einen besitzen die Toxin-exprimierenden Parasiten zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung ihr volles Antigenrepertoire. Dadurch besteht nicht die Gefahr, dass ein möglicherweise gut für Immunisierungen geeignetes Parasitenantigen bei der Gendeletion entfernt wird. Zum anderen hatten die Parasiten keine Möglichkeit, im Laufe der Evolution Mechanismen gegen die toxische Wirkung speziesfremder Proteine zu entwickeln. Weiterhin kann bei Verwendung eines stadienspezifischen Promotors zur Attenuierung von Parasiten auf eine langwierige Suche nach leberstadienspezifischen essentiellen Parasitengenen verzichtet werden. Somit bietet dieser Ansatz eine sehr gute Alternative, um relativ schnell attenuierte Plasmodiumparasiten herstellen und hinsichtlich verschiedener Fragestellungen analysieren zu können. Zur Eliminierung von *P. berghei* Parasiten durch die stadienspezifische Expression eines toxisch wirkenden Moleküls wurden verschiedene Strategien getestet.

So wurde zunächst versucht, eine Attenuierung der Leberstadienparasiten durch die Expression dominant-negativer, mutierter Proteine zu erreichen (Daten nicht gezeigt).

Unter anderem konnten bei T. gondii auf diesem Wege bereits Wachstumsdefekte in den Parasiten erzeugt werden (Khan et al., 2002; van Dooren et al., 2009). Für die Attenuierung von Plasmodium Leberstadien erschien die Expression mutierter Kinasen als geeignet (Falae et al., 2010). Insbesondere Kinasen, die an der Regulation der Replikation beteiligt sein könnten, wurden als Kandidaten für die Versuche ausgewählt, da die Parasiten in der Leberphase einer starken Replikationsrate unterliegen und somit erwartet wurde, dass die Parasiten empfindlich auf eine Störung in der Replikationsmaschinerie reagieren würden. Erste Versuche mit mutierten, putativen Cyklin-abhängigen Kinasen hatten in P. berghei jedoch keinen Einfluss auf die Parasitenentwicklung in der Leberphase. Vermutlich sind die verwendeten Kinasen für die Leberphasenentwicklung der Parasiten entgegen der Erwartungen nicht essentiell und/oder die hergestellten mutierten Proteine führen nicht zu einem dominantnegativen Effekt. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die eingeführten Mutationen die Funktion der putativen Kinasen nicht beeinträchtigten. Um dies zu untersuchen, könnten die unveränderten und die mutierten Proteine rekombinant exprimiert und hinsichtlich ihrer Aktivität analysiert werden.

Neben dem Ansatz, mit dominant-negativen Proteinen eine Attenuierung zu erzeugen, wurde weiterhin versucht, die Plasmodiumparasiten in der Leberphase durch die Expression membranolytischer Proteine zu eliminieren, die die PPM und die PVM lysieren und somit die Entwicklung des Parasiten vorzeitig blockieren sollten. Hierfür wurde unter anderem das antimikrobiell wirkende NK-2 Peptid (Gelhaus et al., 2008; Jacobs et al., 2003) ausgewählt (Daten nicht gezeigt). Das NK-2 Peptid besteht aus den Aminosäuren 39 bis 65 des NK-Lysins, dem porzinen Homolog zum humanen Granulysin, welches von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen sekretiert wird. Für NK-2 konnte, neben einer lytischen Aktivität gegen Candida albicans sowie gram-positive und -negative Bakterien auch eine lytische Wirkung gegenüber Typanosoma cruzi und P. falciparum Blutstadienparasiten gezeigt werden (Gelhaus et al., 2008; Jacobs et al., 2003). Die intrazelluläre Expression von NK-2::V5 Proteinen in P. berghei Leberstadien führte jedoch nicht zu einer Lyse der Parasiten. Bei den Experimenten mit T. cruzi und P. falciparum wurde synthetisch hergestelltes NK-2 eingesetzt, welches zu den Zellen gegeben wurde und deshalb auf die Außenseite der Plasmamembran wirkt (Gelhaus et al., 2008; Jacobs et al., 2003). Es besteht demnach die Möglichkeit, dass intrazellulär exprimierte NK-2::V5-Peptide auf der Innenseite der PPM ihre lytische Wirkung nicht optimal entfalten konnten. Weiterhin wäre es auch möglich, dass das V5-Epitop die Wirkung der NK-2-Peptide beeinträchtigte.

Da Plasmodiumparasiten selbst membranaktive Proteine exprimieren, die eine für porenformende Proteine charakteristische MACPF-Domäne aufweisen und die für

Transmigrationsprozesse essentiell sind, war es nahe liegend, auch eines dieser Proteine im Rahmen dieser Arbeit zu verwenden, um die PVM vorzeitig zu zerstören. Hierfür wurde das putativ porenformende SPECT2 Protein ausgewählt, das normalerweise nur von Sporozoiten exprimiert wird (Ishino et al., 2005a) (Daten nicht gezeigt). Die transgenen Parasiten wurden so konstruiert, dass sie das Protein in die PV sezernieren sollten. Zwar exprimierten diese Parasiten in der Leberphase tatsächlich SPECT2::V5 Proteine, die zum Teil auch in der PV/PVM verteilt waren, aber es kam nicht zu einer Ruptur der PVM. Die transgenen Parasiten entwickelten sich im Vergleich mit Wildtypparasiten normal und konnten die Leberphase vollständig unter Abknospung von Merosomen beenden. Vermutlich reichte in diesem Fall die Expression von SPECT2 allein nicht aus, um die PVM zu perforieren und hierdurch die Parasiten zu eliminieren. Wie anhand von Versuchen mit SPECT1- bzw. SPECT2-Deletionsmutanten gezeigt wurde, werden für die Transmigration der Sporozoiten sowohl SPECT1- als auch SPECT2-Proteine benötigt (Amino et al., 2008; Ishino et al., 2005a; Ishino et al., 2004). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass sich SPECT1 und SPECT2 in ihrer Wirkung ergänzen. Eine weitere Erklärung wäre, dass SPECT2 die PVM aufgrund der Membranbeschaffenheit nicht perforieren kann. Im Normalfall wird SPECT2 wie beschrieben für die Transmigration der Sporozoiten also auf der Zellaußenseite benötigt. Der genaue Vorgang der Membranbindung und möglichen Porenbildung ist jedoch noch nicht abschließend erforscht, so dass durchaus die Möglichkeit besteht, dass die PVM keine geeignete Angriffsfläche für SPECT2 bietet. Für das porenformende Protein TgPLP1 aus dem nahen Verwandten von Plasmodium, T. gondii, konnte hingegen gezeigt werden, dass es sowohl auf der Innen- als auch auf der Außenseite der PVM binden und Poren bilden kann (Roiko and Carruthers, 2009). Somit würde eine Expression von TaPLP1 in P. berghei Parasiten eventuell zu einer Ruptur der PVM in der Leberphasenentwicklung führen.

Neben porenformenden Proteinen der Parasiten wurden auch bakterielle porenformende Zytolysine in dem beschriebenen Modellsystem getestet. Im Rahmen der von S. Horstmann durchgeführten Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe wurde eine mutierte Variante des porenformenden Proteins LLO in Leberstadienparasiten exprimiert (vgl. Horstmann, 2008). Diese LLO-Mutante war, wie das im Rahmen dieser Arbeit getestete PFO, im neutralen pH-Bereich aktiv. Im Gegensatz zum PFO::V5 war das LLO jedoch ausschließlich im Parasitenzytosol verteilt. Auch die Verwendung des Expl-Signalpeptids führte nicht zu einer Insertion von LLO in die PVM. Zusammenfassend konnte durch die Expression von LLO in der Leberphase von *P. berghei* keine Attenuierung der Parasiten erreicht werden (Horstmann, 2008). Hingegen führte die leberphasenspezifische Expression von PFO::V5 erfreulicherweise

zur PVM/PPM-Lyse und zur Attenuierung des Parasiten. Eventuell unterscheiden sich PFO und LLO hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften bestimmte an Oberflächenstrukturen auf ihren Zielmembranen. Es wäre möglich, dass LLO auf bestimmte Oberflächenstrukturen angewiesen ist, die in der PVM in dieser Weise nicht auftreten, so dass eine Bindung an die Membran nicht möglich ist. PFO hingegen benötigt für die Bindung keine höher geordneten Lipidstrukturen (lipid rafts) in der Membran und besitzt somit ein relativ breites Wirkungsspektrum (Nelson et al., 2008), welches vermutlich letztlich für die lytische Wirksamkeit von PFO in P. berghei Leberstadien verantwortlich ist.

Die in diesem Abschnitt geschilderten Beobachtungen verdeutlichen, dass für die Entfaltung der toxischen Wirkung eines Proteins in den Parasiten bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein müssen, wie z.B. die korrekte Proteinfaltung, ein erfolgreicher Proteintransport Vorliegen sowie das essentieller Ziel-/Oberflächenstrukturen. Ob die Parasiten diese Bedingungen zu ihrer Verteidigung gegen toxisch wirkende Proteine teilweise "aktiv" beeinflussen, z.B. durch einen verstärkten Abbau fremder oder zu diesem Zeitpunkt nicht benötigter Proteine, müsste näher untersucht werden. Im Fall der Expression von PFO::V5 scheinen die Bedingungen in den Leberphasenparasiten für eine effiziente Toxinwirkung hingegen optimal zu sein.

Die PFO::V5-Expression führt zur Freisetzung von Proteinen ins Wirtszellzytosol und zum Sterben der Parasiten in der fortgeschrittenen Schizogonie

Anhand der PbPFO_{LS}-Parasiten wurde untersucht, welche Auswirkungen eine

leberphasenspezifische Expression von PFO::V5-Proteinen für die Parasiten hat. Die Ergebnisse der Analysen zeigten, dass die PFO-Expression bereits 30 h nach Infektion bei einem Teil der Zellen eine Freisetzung von GFP aus dem Parasitenzytosol in die Wirtszelle bewirkte. Da fluoreszierende Proteine wie GFP und RFP (rot fluoreszierendes Protein) unter normalen Umständen weder durch die PVM noch durch die PPM diffundieren können (Sturm et al., 2009), mussten sowohl die PVM als auch die PPM beschädigt worden sein. Die beobachtete Verteilung von PFO::V5-Proteinen in der PVM lässt darauf schließen, dass PFO auch in der Lage ist, an die PVM zu binden und diese direkt zu perforieren. Die bisherigen Ergebnisse erlauben jedoch

noch keine eindeutige Aussage, ob auch die PPM direkt durch PFO::V5-Proteine perforiert oder erst indirekt nach der Lyse der PVM beschädigt wurde. So wäre es

denkbar, dass PFO::V5-Moleküle in die PV sekretiert werden und dort parallel die PVM und die PPM angreifen. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, dass PFO::V5-Moleküle die PPM bereits vom Parasitenzytosol heraus angreifen. In der IFA von PbPFO_{LS}-Parasiten wurde auch eine Verteilung von PFO::V5-Molekülen im Parasitenzytosol beobachtet, so dass eine mögliche Perforation der PPM von innen heraus prinzipiell denkbar wäre. Diese Vermutungen müssen jedoch noch experimentell belegt werden.

Die Perforation der PVM/PPM führt bei den PbPFO_{LS}-Parasiten jedoch nicht sofort zur vollständigen Auflösung der PVM bzw. PPM. Konfokale Videomikroskopieaufnahmen zeigten, dass die Freisetzung von GFP aus den PbPFO_{IS}-Parasiten ein relativ schneller Prozess war, der innerhalb von 20 min zu einer homogenen Verteilung von GFP in der gesamten Wirtszelle führte. Dennoch waren die Parasiten noch über Stunden nach der PVM/PPM-Lyse von einer Membran umgeben, wie auch in IFA-Aufnahmen zu erkennen war. Bei der Membran könnte es sich um die PPM handeln, allerdings steht der Nachweis noch aus. Das bisher einzig bekannte PPM-Markerprotein Mspl wird erst in der späten Leberphase (>50 hpi) exprimiert, also zu einem Zeitpunkt, an dem der überwiegende Anteil der PbPFO_{LS}-Parasiten bereits stark degradiert vorliegt. Durch Forschungsarbeiten in unserer Arbeitsgruppe am BNI ist es vor kurzem jedoch gelungen, die PPM über Fluoreszenzproteine zu markieren, die mit einer PH- (*Pleckstrin homology*) Domäne fusioniert worden sind (C. Deschermeier, persönliche Mitteilung). Unter Verwendung dieses Konstrukts können somit transgene Parasiten hergestellt werden, die leberphasenspezifisch PFO::V5- und PH-GFP-Proteine exprimieren. Die videomikroskopische Analyse dieser Parasiten würde es ermöglichen, die PPM während der gesamten Parasitenentwicklung zu beobachten und zu verfolgen. Anhand der hierbei erhaltenen Ergebnisse sollte es dann möglich sein, die Identität der oben angesprochenen Membran zu klären sowie zu verfolgen, wie lange der Parasit seine Plasmamembran nach Beginn der PFO-Expression noch aufrechterhalten kann.

Zusätzlich wurden viele Parasiten noch von einer weiteren Membran umgeben, wie in der IFA zu beobachten war. Von dieser wurde zunächst vermutet, dass es sich um die nicht vollständig abgebaute PVM handelte. Eine Färbung der fixierten PbPFO_{LS}-Parasiten mit Anti-Expl-Antikörpern konnte das nicht bestätigen. Vielmehr lag Expl nur noch granulär verteilt im Wirtszellzytoplasma vor, was auf eine fortgeschrittene Degradation der PVM hindeutete. Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass es sich bei der Membran um die PVM handelte, die bereits kein Expl mehr enthielt. Dieses wäre denkbar, da die Parasiten nach der PVM/PPM-Perforation stark geschädigt sind und somit höchst wahrscheinlich kein Transport von Proteinen wie Expl mehr stattfindet.

Auch bei der Beantwortung der Frage nach der Herkunft dieser zweiten Membran könnte ein in unserer Arbeitsgruppe hergestellter Parasitenstamm, der ein fluoreszierendes Protein in die PVM integriert, helfen (Graewe et al., 2011). Dazu sind, analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise, transgene Parasiten herzustellen, die leberphasenspezifisch PFO::V5- sowie Expl-mCherry-Proteine exprimieren. Die Analyse dieser und der oben angesprochenen "PH-GFP_PFO_{LS}"-Parasiten würde erlauben Rückschlüsse darüber zu ziehen, wie die PFO-induzierte PVM- und PPM-Perforation erfolgt und wie der Parasit auf die jeweiligen Vorgänge reagiert.

Als ein wichtiges Ergebnis dieses Teils der Arbeit bleibt aber festzuhalten, dass 48 h nach Infektion fast alle transgenen PFO-expimierenden Parasiten einen veränderten Phänotyp aufwiesen. Viele der beobachteten Parasiten hatten, wie erhofft, ein fortgeschrittenes Schizontenstadium erreicht, bevor es zur PVM/PPM-Lyse kam.

Auffällig war, dass PbPFO_{LS}-Parasiten 48 h nach Infektion eine deutlich kleinere Zahl an Nuklei aufwiesen, die dazu noch einen veränderten Phänotyp zeigten. Offenbar kommt es nach der PVM/PPM-Lyse zu einer Degradation der Parasitennuklei, was wiederum ein deutliches Zeichen für das Absterben der Parasiten ist. Durch eine videomikroskopische Analyse der PFO::V5-exprimierenden Parasiten, die zusätzlich ein fluoreszierendes DNA-bindendes Markerprotein exprimieren, könnte die Veränderung der Morphologie und der Anzahl der PbPFO_{LS}-Nuklei während und nach der PVM/PPM-Ruptur beobachtet werden. Anbieten würde sich hier die Expression des Histon 2Bv-Proteins als Fluoreszenzproteinchimäre, wie es bereits in unserer Arbeitsgruppe bei der Analyse der Organellverteilung durchgeführt wurde (Stanway et al., 2011).

Die Frage, wann die PbPFO_{LS}-Parasiten sterben, ist durch die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse nicht vollständig zu beantworten. Es ist wahrscheinlich, dass dies unmittelbar nach der PVM/PPM-Lyse geschieht. In einer Studie an *T. gondii*-infizierten Zellen wurde gezeigt, dass es nach der Lyse der PVM zu einem schnellen Influx von Proteinen aus dem Wirtszellzytosol sowohl in die PV als auch kurze Zeit später in das Parasitenzytosol kam, woraufhin sich die Morphologie des Parasiten sofort veränderte. Die Wissenschaftler schlossen daraus auf einen unmittelbar auf die PVM-Lyse folgenden Tod des Parasiten (Zhao et al., 2009).

Über die genauen Abläufe des Absterbens der PbPFO_{LS}-Parasiten kann bisher nur spekuliert werden. Generell gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie der Tod einer Zelle und deren Degradation ablaufen kann. Oftmals handelt es sich dabei um reguliert ablaufende Prozesse. So sind auch viele Protozoen in der Lage, einen geordneten

Zelltod zu durchlaufen, obwohl ihnen teilweise wichtige Schlüsselmoleküle fehlen, die für apoptotische Prozesse wichtig sind (z.B. Caspasen) (Bruchhaus et al., 2007). Für *Plasmodium*-Ookineten konnte beispielsweise ein regulierter Zelltod gezeigt werden, der eine Chromatinkondensierung, DNA-Fragmentierung und eine PS-Präsentation auf der Zellaußenseite beinhaltet und der erfolgt, bevor die Ookineten das Mitteldarmepithel transmigrieren (Al-Olayan et al., 2002). Allerdings ist das Ablaufen eines regulierten Zelltodes bei den PbPFO_{LS}-Parasiten nach der PVM/PPM-Perforation relativ unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass der Parasit nach der PVM/PPM-Perforation seinen zytoplasmatischen Inhalt ins Wirtszellzytosol abgibt, so dass er Prozesse, die für sein Überleben wichtig sind, nicht mehr aufrechterhalten kann.

Es ist weiterhin anzunehmen, dass es auch zu einem Influx von Proteinen/Molekülen aus dem Wirtszellzytosol in den Parasiten kommt. Somit könnten auch Moleküle in den PbPFO_{LS}-Parasiten gelangen, die zu dessen Degradation beitragen. Vor dem Hintergrund, dass intrazellulär lebende Parasiten "Fremdkörper" für ihre Wirtszellen darstellen, ist es sogar wahrscheinlich, dass die Wirtszellen aktiv versuchen die Parasiten zu entfernen, sobald sie diese als solche erkannt haben. Vor der PVM-Lyse ist der Parasit in seiner Vakuole weitgehend vom Zugriff durch Abwehrmechanismen der Wirtszelle geschützt.

Generell besitzt eine Wirtszelle verschiedene Mechanismen, um sich gegen pathogene Eindringlinge wie Parasiten, Bakterien oder Viren zur Wehr zu setzen und diese zu entfernen. Beispielsweise können wirtszellfremde ebenso wie zum Abbau bestimmte wirtszelleigene zytosolisch vorliegende Proteine durch eine Polyubiquitinierung an Lysinresten markiert und hierdurch dem proteolytischen Abbau durch das Proteasom der Wirtszelle zugeführt werden. Peptidfragmente, der auf diesem Weg abgebauten Proteine, können den Immunzellen im Anschluss auf der Zelloberfläche über MHC-Klasse-I-Komplexe präsentiert werden (Ligeon et al., 2011).

Weiterhin besteht für die Wirtszelle auch die Möglichkeit, pathogene Eindringlinge mit Hilfe von Autophagie zu beseitigen (Ligeon et al., 2011; Rautou et al., 2010). Dabei werden die Pathogene zunächst mit einer Membran umgeben und dann, durch Fusion mit Lysosomen, abgebaut (Bruchhaus et al., 2007; Rautou et al., 2010). Einige der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen bei PbPFO_{LS}-infizierten Zellen sowie erste Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe zum diesem Thema deuten auf eine mögliche Beteiligung autophagischer Prozesse bei der Beseitigung absterbender Parasiten im Allgemeinen und der PbPFO_{LS}-Parasiten im Besonderen hin. Generell nutzen eukaryotische Zellen Autophagie aber dazu, um bei Nährstoffmangel durch den Abbau zelleigener Organellen neue Nährstoffe zu erhalten. Eine interessante Studie mit *T. gondii* konnte zeigen, dass die Parasiten die Autophagie der Wirtszelle offenbar

Nährstoffbedarfs induzieren, hierüber die Sicherung ihres bzw. die um Nährstoffaufnahme aus der Wirtszelle zu gewährleisten. Dabei wurde eine Akkumulation autophagischer Vesikel nahe der PVM beobachtet. Diese Vesikel waren durch die Exposition des Markerproteins für Autophagosomen, LC3, gekennzeichnet. Die Autophagieinduktion erfolgte hier unabhängig vom eigentlich zentralen Kontollprotein der Autophagie, mTOR, in einer Ca²⁺-abhängigen Weise (Wang et al., 2009). Somit sind die Parasiten offensichtlich in der Lage, ihre Eliminierung durch Autophagie zu verhindern und nutzen vielmehr die durch Autophagie bereitgestellten Nährstoffe für ihr Wachstum. Erste in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studien zur Р. berghei-infizierten Hepatomazellen Autophagie in zeigen, dass Plasmodiumparasiten Autophagie in der Wirtszelle induzieren (S. Gräwe, persönliche Mitteilung), wahrscheinlich um an Nährstoffe zu gelangen. Auf der anderen Seite werden manche Parasiten komplett von einer LC3-positiven Membran umgeben. Diese Parasiten sterben und werden abgebaut. Es scheint also ein sehr empfindliches Gleichgewicht zwischen für den Parasiten nützlicher Autophagie und den autophagischen Prozessen, die dem Parasiten schaden, zu geben.

Im Fall der PbPFO_{LS}-Parasiten könnte sich dieses Gleichgewicht nach der PVM/PPM-Ruptur zum Vorteil der Wirtszellen verschoben haben, da die Parasiten durch die Perforation ihrer Membranen stark geschwächt bzw. getötet wurden und nicht mehr in der Lage sind, die Wirtszellautophagie aktiv zu kontrollieren. Möglicherweise werden bei der PVM/PPM-Lyse auch Strukturen freigelegt, die von den Ubiquitin-Ligasen erkannt und für den proteolytischen Abbau im Autophagosom (und/oder Proteasom) markiert werden, was die Autophagie induziert.

Bei der beobachteten Expl-negativen Membran, die die Parasiten zusätzlich umgab, könnte es sich also theoretisch auch um die Membran eines Autophagosoms handeln. Es wird vermutet, dass ein Teil der Membran, die für den Aufbau eines Autophagosoms benötigt wird, vom ER geliefert wird (Tooze and Yoshimori, 2010). Da Plasmodium in der Leberzelle teilweise mit dem ER der Wirtszelle assoziiert ist (Bano et al., 2007), könnte das tatsächlich der Ursprung dieser Membran sein. Dies könnte unter anderem videomikroskopisch anhand PbPFO_{LS}-infizierter, LC3-GFPexprimierender Zellen analysiert werden, deren ER zuvor mit einem ER-Farbstoff (z.B. ER-Tracker) angefärbt wurde. Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe lassen aber auch den Schluss zu, dass die PVM, die im Schizontenstadium LC3-Proteine enthält (N. Eickel, persönliche Mitteilung), nach der PVM/PPM-Perforation in den PbPFO_{LS}-Parasiten vollständig zur Autophagosomenmembran umgebaut wird. In T. gondii konnte nach einer PVM-Ruptur keine spezifische Assoziation von LC3-Molekülen mit der ruptierten Vakuole festgestellt werden, so dass eine Beteiligung von Makroautophagie am Tod der *T. gondii* Parasiten in diesem Fall ausgeschlossen wurde (Zhao et al., 2009). Da es bei diesen Parasiten jedoch zum anschließenden Tod der Wirtszelle kam, laufen nach der PVM-Ruptur bei *T. gondii* und den PbPFO_{LS}-Parasiten offensichtlich sehr unterschiedliche intrazelluläre Vorgänge ab.

Sollte es sich bei der beobachteten Membran tatsächlich um ein Autophagosom handeln, welches die PbPFO_{LS}-Parasiten nach der PVM/PPM-Ruptur umgibt, ist allerdings nicht klar, warum der Parasit noch GFP-positiv ist, während das "Autophagosom" bereits kein GFP mehr enthält. Es ist bekannt, dass GFP in einer sauren Umgebung, wie sie nach der Fusion eines Autophagosoms mit einem Lysosom vorliegt, seine Fluoreszenz verliert (Kimura et al., 2007). Dies spricht dafür, dass es vermutlich auch bei den in dieser Arbeit beobachteten GFP-negativen "Autophagosomen" bereits zu einer Fusion mit Lysosomen gekommen ist. Möglicherweise sind die PbPFO_{LS}-Parasiten nach der PFO-induzierten PVM/PPM-Perforation zunächst noch in der Lage, ihre Plasmamembran zumindest teilweise wieder zu reparieren. Dieses würde für eine gewisse Zeit unter anderem den Einstrom von autolysosomalen Komponenten in das Parasitenzytoplasma erschweren bzw. blockieren. Moleküle, die sich innerhalb des Parasiten befinden, wären somit zunächst vor einer Degradation geschützt, während Moleküle, die sich außerhalb des Parasiten im "Autophagosom" befänden, unmittelbar abgebaut werden würden.

Fragen hinsichtlich einer potentiellen Degradation der PbPFO_{LS}-Parasiten durch Wirtszellautophagie müssen in zukünftigen Experimenten beantwortet werden. So ist zum einen die Identität der oben beschriebenen "zusätzlichen" Expl-negativen Membran zu klären. Wird die PVM tatsächlich zur Membran eines Autophagosoms umgebaut und wenn ja, wie läuft dieser Vorgang ab? Eine hieraus resultierende wichtige Frage wäre dann, ob und wie Wildtypparasiten diesen Vorgang verhindern? Ebenso ist es von Interesse zu untersuchen, ob es bei den PbPFO_{LS}-Parasiten tatsächlich zu einer Fusion des "Autophagosoms" mit Lysosomen kommt. Scheinbar findet dieser Fusionsprozess in mit Wildtypparasiten infizierten Zellen nicht statt, obwohl die Parasiten mit einer LC3-positiven Membran umgeben sind. Sollten die Wildtypparasiten die Verschmelzung mit Lysosomen aktiv blockieren, ist es eventuell möglich, die hiefür verantwortlichen Faktoren über den Vergleich von Wildtyp- und PbPFO_{LS}-Parasiten zu identifizieren, z.B. über die veränderte Zusammensetzung der PVM nach der PVM/PPM-Lyse. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Malariamedikamente wäre es bei Kenntnis dieser potentiellen Faktoren somit eventuell möglich, die Schutzmechanismen, die die Parasiten vor einer lysosomalen Zerstörung schützen, aufzuheben und hierdurch die Parasiten in der Leberphase zu eliminieren.

Neben Autophagie besitzt eine Wirtszelle weiterhin die Möglichkeit, sich selbst und damit auch intrazelluläre Pathogene durch Apoptose zu eliminieren. Eine Apoptose der PbPFO_{LS}-infizierten Wirtszellen konnte nach der PVM/PPM-Lyse jedoch nicht beobachtet werden. Dieses Ergebnis war sehr überraschend, da bereits publiziert wurde, dass vitale Plasmodiumparasiten die Apoptose der Wirtszelle verhindern (van de Sand et al., 2005) und der Tod des Parasiten die Apoptose der Wirtszelle nach sich zieht (Leiriao et al., 2005b). Deswegen wurde erwartet, dass auch die PbPFO_{LS}infizierten Wirtszellen nach der PVM/PPM-Lyse der Parasiten Apoptose induzieren. Wahrscheinlich bleibt der, vom Parasiten induzierte, anti-apoptotische Mechanismus Ein Kandidat dafür wäre das anti-apoptotisch wirkende bestehen. Parasitenprotein PbICP (Rennenberg et al., 2010), das in die Wirtszelle abgegeben wird. Tatsächlich konnte in den PbPFO_{LS}-infizierten Wirtszellen nach der PVM/PPM-Lyse PbICP nachgewiesen werden. Da aber auch noch mehrere Stunden nach der PVM/PPM-Lyse, also zu einem Zeitpunkt an dem die betreffenden anti-apoptotischen Moleküle vermutlich bereits abgebaut wurden, keine Apoptose infizierter Wirtszellen beobachtet werden konnte, sind wahrscheinlich weitere, noch unbekannte Faktoren am Überleben der Wirtszelle nach dem Tod des Parasiten beteiligt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt hinsichtlich des Überlebens PbPFO_{LS}-infizierter Wirtszellen nach der PVM/PPM-Lyse ist, dass die PbPFO_{LS}-Parasiten nicht in der Lage sind, den "ungewöhnlichen" Tod der Wirtszelle zu induzieren, der bei normaler Parasitenentwicklung am Ende der Leberphase des Parasiten abläuft. Dieser ungewöhnliche Wirtszelltod verläuft vermutlich über streng regulierte, kaskadenartige Prozesse unter Beteiligung verschiedener Proteasen (Blackman, 2008) und Kinasen (Falae et al., 2010; McRobert et al., 2008; Taylor et al., 2010) des Parasiten. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Parasiten einige dieser Schlüsselproteine erst sehr spät in der Leberphase exprimieren, um diese Prozesse zu initiieren. Da PbPFO_{LS}-Parasiten schon während des Schizontenstadiums die PVM-Lyse einleiten, ist anzunehmen, dass diese Proteine zu diesem Zeitpunkt noch nicht exprimiert werden. Die PbPFO_{Ls}-Parasiten sind damit hervorragend geeignet, um die Proteine zu identifizieren, die den Wirtszelltod initiieren. Dazu müssten die in Frage kommenden Proteine früher als in Wildtypparasiten exprimiert werden. Hierfür bietet sich wieder der leberphasenspezifische Promotor an, der die Expression von Proteinen schon nach 30 h erlaubt.

Proteine, die sehr wahrscheinlich an der PVM-Lyse und eventuell am Wirtszelltod beteiligt sind und auch sehr spät exprimiert werden, sind die Papain-ähnlichen SERA (Serine Repeat Antigen) Proteine, putative Cysteinproteasen. Nach der Lyse der PVM

gelangen diese Proteine ins Wirtszellzytoplasma (Putrianti et al., 2010; Salmon et al., 2001; Schmidt-Christensen et al., 2008; Sturm and Heussler, 2007). Auch bei PbPFO_{LS}-Parasiten (48 hpi) konnten SERA2 Proteine nachgewiesen werden. Allerdings war hier die SERA2-Konzentration, vermutlich durch die erst in diesem Zeitraum beginnende Expression, relativ schwach, so dass ein eindeutiger Nachweis von SERA2 im Wirtszellzytosol nicht möglich war. Entweder war also die Konzentration der SERA-Proteasen nicht ausreichend oder die alleinige Anwesenheit der SERAs genügt nicht, um den Tod der Wirtszelle zu induzieren. Es ist bekannt, dass die SERA-Proteine proteolytisch prozessiert werden (Yeoh et al., 2007). Demnach bedarf es wahrscheinlich weiterer Schlüsselproteine, die zu einem noch späteren Zeitpunkt exprimiert werden und die die Aktivierung der putativen SERA-Proteasen initiieren. In diesem Zusammenhang spielen zwei weitere Proteasen eine essentielle Rolle: die

Serinprotease Subtilisin-1 (SUB-1) sowie die Dipeptidylpeptidase 3 (DPAP3), eine Cysteinprotease (Arastu-Kapur et al., 2008; Blackman, 2008; Pandey et al., 2006). Einem Modell zufolge, welches für Blutstadienparasiten aufgestellt wurde, aktiviert DPAP3 innerhalb der Merozoiten zunächst SUB-1. Im Anschluss gelangt aktiviertes SUB-1 in die PV, wo es verschiedene SERA-Proteine durch proteolytische Spaltung aktiviert. Dieses führt zur Ruptur der PVM und schließlich auch der Wirtszell-Plasmamembran (Arastu-Kapur et al., 2008; Yeoh et al., 2007). Eine ähnliche Kaskade könnte in infizierten Leberzellen letztlich zum Tod der Wirtszelle führen. Erste Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe deuten auf eine essentielle Funktion von DPAP3 am Ende der Leberphase hin (A. Heitmann, persönliche Mitteilung). DPAP3 wird im Normalfall erst zum Ende der Leberphase (ca. 60 hpi) exprimiert und ist somit in den PbPFO_{LS}-Parasiten sehr wahrscheinlich nicht vorhanden. Interessanterweise führt eine ektopische Expression von DPAP3 ab ca. 30 hpi (unter Kontrolle der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendeten leberphasenspezifischen Promotorregion) zu einer vorzeitigen Bildung abgelöster Zellen und Merosomen (A. Heitmann, persönliche Mitteilung). Dies deutet darauf hin, dass DPAP3 entweder direkt oder indirekt mit einer wichtigen Funktion am ungewöhnlichen Wirtszelltod in der Leberphase beteiligt ist. Demnach wäre DPAP3 der erste Kandidat für eine Expression in PbPFO_{Ls}-Parasiten. Handelt es sich bei DPAP3 um das gesuchte Protein, das den Wirtszelltod induziert, sollte die Wirtszelle absterben, wenn DPAP3 durch die vorzeitige Lyse der PVM/PPM in die Wirtszelle gelangt.

Allerdings könnte es sein, dass auch DPAP3 zunächst selbst aktiviert werden muss. In Verbindung hiermit ist die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) des Parasiten von Interesse, die vermutlich an den regulatorischen Prozessen des ungewöhnlichen Wirtszelltodes beteiligt ist. Hierbei handelt es sich um eine Serin-/Threoninkinase die

verschiedene Substrate in einem cGMP-abhängigen Mechanismus phosphoryliert und sowohl bei der Gametogenese als auch bei der Bildung/Freisetzung von Merozoiten in Leber- und Blutstadienparasiten eine essentielle Rolle spielt (Falae et al., 2010; McRobert et al., 2008; Taylor et al., 2010). Die PKG wird bereits ab 24 h nach Infektion in Leberstadienparasiten exprimiert und ist somit sehr wahrscheinlich auch in den PbPFO_{LS}-Parasiten vorhanden. Interessanterweise zeigten *P. berghei* Parasiten, deren pkg-Gen durch einen konditionalen knockout im Sporozoitenstadium deletiert wurde, in der späten Leberphase eine Arretierung in der Merosomenbildung (Falae et al., 2010). So wäre es denkbar, dass die PKG zuerst das neu synthetisierte DPAP3 aktiviert, bevor weitere Schritte, die zum ungewöhnlichen Wirtszelltod führen, ablaufen können. Neben DPAP3 wäre auch die ektopische Expression anderer möglicher Protease-Kandidaten in den PbPFO_{LS}-Parasiten von Interesse. So könnten die Effekte einer wesentlich früheren Expression und Freisetzung von putativen SERA Proteasen ins Wirtszellzytosol untersucht werden. Im Vergleich mit transgenen Parasiten, die ebenfalls diese putative Protease exprimieren, aber nicht vorzeitig ihre zytosolischen Bestandteile ins Wirtszellzytosol entlassen, könnten so Informationen der untersuchten Proteine hinsichtlich ihrer Funktion und eventuell benötigter Aktivierungsschritte erhalten werden. Ebenfalls wäre auch eine kombinierte Expression von SERA-Proteinen mit DPAP3 oder SUB-1 in den PbPFO_{LS}-Parasiten denkbar, um zu analysieren, ob es erst unter Verwendung einer dieser Kombinationen zu einem früheren Wirtszelltod kommt. Dieses würde wiederum auf eine proteolytische Aktivierung der Proteine hindeuten.

Entsprechende Experimente wurden innerhalb der Arbeitgruppe bereits begonnen und es ist schon jetzt absehbar, dass die in dieser Arbeit beschriebenen PbPFO_{LS}-Parasiten eine entscheidende Rolle bei der Aufklärung der molekularen Vorgänge während des Wirtszelltodes spielen werden.

Das Überleben der Wirtszelle nach der PVM/PPM-Ruptur ist auch hinsichtlich der Tatsache überraschend, dass die PbPFO_{LS}-Parasiten mit PFO ein membranolytisches Toxin exprimieren, das letztlich auch in das Wirtszellzytoplasma gelangt. PFO ist für Zellen jedoch normalerweise toxisch (Jones et al., 1996). Experimente, in denen mutierte *L. monocytogenes* Bakterien PFO anstelle von LLO exprimierten, führten erwartungsgemäß zur Lyse des Phagosoms. Weiterhin wurde dabei aber auch die Wirtszelle lysiert, was zu deren Tod führte (Jones and Portnoy, 1994; Jones et al., 1996). Die gleiche Entwicklung konnte bei Experimenten mit transgenen, PFO-exprimierenden *Bacillus subtilis* Bakterien in Makrophagen beobachtet werden (Portnoy et al., 1992). Für eine effektive Membranlyse der PbPFO_{LS}-infizierten Wirtszellen war die Konzentration von PFO::V5-Proteinen im Wirtszellzytosol

dementsprechend sehr wahrscheinlich zu gering. Die Ergebnisse der IFA, bei der keine PFO::V5-Färbung im Wirtszellzytosol gezeigt und selbst im Zytosol vieler Parasiten nur wenig PFO::V5 nachgewiesen werden konnte, stützen diese Vermutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Arbeiten am Malaria-Nagetierpathogen *P. berghei* durchgeführt. Es stellt sich jedoch die Frage, ob dieses System auch in anderen *Plasmodium*-Spezies, z.B. für eine mögliche zukünftige Verwendung in den humanpathogenen *P. falciparum* Parasiten, eingesetzt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression eines Transgens in *P. falciparum* unter der Kontrolle eines *P. chabaudi* Promotors möglich ist (Crabb et al., 1997). Somit wäre es prinzipiell denkbar, dass das in dieser Arbeit beschriebene Modell auch für die PFO-Expression in Studien mit *P. falciparum* eingesetzt werden könnte, um die Parasiten in der Leberphase zu attenuieren. Dieses setzt selbstverständlich voraus, dass der hier verwendete *P. berghei* Promotor auch in *P. falciparum* stadienspezifisch aktiv ist.

Anfang 2011 wurde erstmals eine Studie zur Deletion eines leberstadienspezifisch exprimierten *P. falciparum* Proteins, LSA-1, publiziert. Dieser *knockout* war für die *P. falciparum* Leberstadien letal (Mikolajczak et al., 2011). Sollte die Verwendung des leberstadienspezifischen *P. berghei* Promotors in *P. falciparum* nicht funktionieren, bestünde somit auch die Möglichkeit, den beschriebenen Pf*lsa-1* Promotor für die Toxinexpression zu verwenden. Hierbei könnte der endogene Pf*lsa-1* Promotor genutzt werden. Durch den Austausch des *lsa-1*-Gens gegen den Toxin-*orf* (z.B. den des PFO) könnten somit in einem Schritt doppelt attenuierte Parasiten hergestellt werden.

Ob die *P. falciparum* Parasiten allerdings auf die PFO-Expression vergleichbar mit den *P. berghei* Parasiten reagieren, ist ungewiss. Aus diesem Grund ist es ratsam, die Expression von PFO und den damit verbundenen Phänotyp auch in anderen Malaria-Nagetiermodellen (*P. yoelii*, *P. chabaudi*) zu testen, um besser einschätzen zu können, wie gut dieses System auf andere Spezies übertragbar ist. Weiterhin ist es sinnvoll, auch andere putativ toxische Proteine zu testen.

Zusammenfassend lässt sich für diesen Abschnitt festhalten, dass die durch die PFO-Expression bewirkte PVM/PPM-Perforation für die Leberstadienparasiten fatale Folgen hat und für die Parasiten, überraschenderweise jedoch nicht für die Wirtszellen, tödlich endet. Es ist also prinzipiell möglich *P. berghei* Parasiten durch eine stadienspezifische Expression eines porenformenden Toxins in der späten Leberphasenentwicklung zu attenuieren. Andere Entwicklungsstadien des Parasiten waren durch die leberphasenspezifische PFO-Expression, wie erwartet, nicht beeinträchtigt.

Die alleinige Expression eines Toxins zu Attenuierungszwecken birgt ein gewisses Risiko. Bei der Expression eines Transgens besteht immer die Gefahr, dass es zu einer Mutation in der kodierenden Seguenz kommt. In der Leberphase ist diese Gefahr zwar eher gering, weil die Zahl der Parasiten, die erfolgreich Leberzellen befallen, sehr gering ist. Dennoch kann eine zufällige Mutation im Toxingen erfolgen und dazu führen, dass kein funktionelles Protein mehr exprimiert wird. Das würde wiederum zur Entstehung voll-virulenter Parasiten führen, die die Leberphase beenden und die pathogene Blutinfektion beginnen können. Eine doppelte Attenuierung zur Erhöhung der Sicherheit, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durch die zusätzliche Deletion des durchgeführt wurde, wichtige Pb*pdh-e1α*-Gens ist dementsprechend eine Verbesserung.

Attenuierung des Parasiten durch Deletion des Pbpdh-e1 α Gens

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Pbpdhe1α-Parasiten entwickelten sich erwartungsgemäß bis in die späte Leberphase hinein normal. Allerdings konnte, wie auch bei P. yoelii pdh-e1 α Deletionsmutanten (Pei et al., 2010), in der späten Leberphase ein signifikanter Größenunterschied im Vergleich mit den Wildtypparasiten festgestellt werden. Während jedoch eine Msp1-Färbung der P. yoelii pdh-e1 α Deletionsmutanten negativ verlief und keine Merozoiten-/Merosomenbildung beobachtet wurde (Pei et al., 2010), war eine geringe Anzahl der Pbpdhe1α-Parasiten in der Lage, die Leberphase in vitro unter Ausbildung Msp1-positiver Merozoiten zu beenden. Dabei fiel auf, dass die Entwicklung der Pbpdhe1α-Parasiten, die die Leberphase beenden konnten, im Vergleich zur Kontrolle verzögert war. Dies lässt den Schluss zu, dass die Deletion des Pbpdh-e1α-Gens schwerwiegende Auswirkungen auf die Parasitenentwicklung hat. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Beobachtungen der Studie mit Pbfabi-Deletionsmutanten vereinbaren. Auch hier kam es zu zeitlich verzögerten breakthrough Infektionen (Yu et al., 2008).

Die Deletion des putativen Pbpdh-e1α-Gens führt mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer massiven Störung des FAS-II-Wegs. Dieser ist für die Parasiten in der späten Leberphase essentiell, um unter anderem Fettsäurebausteine für die Membransynthese und spezielle Fettsäuren z.B. für Membrananker (Tarun et al., 2009; Yu et al., 2008) zu produzieren. In der frühen Leberphase können die Parasiten ihren Bedarf an Fettsäuren noch über die Aufnahme aus der Wirtszelle abdecken, wie anhand von FAS-II-Deletionsmutanten zu erkennen ist. Diese entwickeln sich unter

Ausbildung einer PVM am Anfang des Leberstadiums normal (Pei et al., 2010; Tarun et al., 2009; Vaughan et al., 2009a; Yu et al., 2008). In der *P. yoelii* Leberphase beginnt die Transkription der hauptsächlich am FAS-II-Weg beteiligten Gene *in vivo* ab ca. 30 h nach Infektion (Vaughan et al., 2009a). *In vitro* wurde für *P. berghei* ebenfalls 30 h nach Infektion pdh- $e1\alpha$ -Transkript nachgewiesen. Frühere Zeitpunkte wurden bisher allerdings nicht untersucht, so dass eine bereits früher stattfindende Pbpdh- $e1\alpha$ -Transkription nicht ausgeschlossen werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit und in anderen Studien beobachteten voneinander abweichenden Ergebnisse zwischen P. berghei und P. yoelii Mutanten (Pei et al., 2010; Vaughan et al., 2009a; Vaughan et al., 2009b; Yu et al., 2008) könnten unter anderem in einer unterschiedlich stark ausgeprägten Virulenz der verwendeten Parasitenspezies/-stämme begründet sein, wie sie bei der Blutphase der Parasiten zu beobachten ist. Während P. berghei ANKA Parasiten schnell eine letale Blutinfektion etablieren, können die nicht-letalen *P. yoelii* 17XNL-Parasiten durch Wirtsimmunsystem eliminiert werden (Yu et al., 2008). Eine potentielle breakthrough Infektion von P. yoelii FAS-II-Deletionsmutanten würde somit unter Umständen unerkannt bleiben. Eventuell sind P. yoelii und P. berghei auch unterschiedlich stark auf die de novo Fettsäuresynthese in der Leberphase angewiesen und können zur Deckung ihres Nährstoffbedarfs gegebenenfalls Fettsäuren von der Wirtszelle beziehen (Yu et al., 2008). Die Ergebnisse aus diesen Studien und der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass trotz einer scheinbar sehr hohen Ähnlichkeit deutliche Unterschiede zwischen P. yoelii und P. berghei hinsichtlich der Reaktionen auf genetische Modifikationen bestehen. Vermutlich stellt das verwendete P. berghei System aufgrund teilweise auftretender breakthrough Infektionen im Vergleich zu P. yoelii ein empfindlicheres System dar, um die Auswirkungen von Gendeletionen zu Attenuierungszwecken zu untersuchen.

Diese Befunde verdeutlichen sehr gut, dass Ergebnisse, die für eine *Plasmodium*-Spezies erarbeitet wurden, nicht einfach auf andere *Plasmodium*-Spezies übertragen werden können. Dies ist vor Allem bei der Herstellung genetisch attenuierter *P. falciparum* Parasiten zu bedenken.

Zusammenfassend lässt sich für diesen Abschnitt festhalten, dass auch die Deletion des Pbpdh-e1α-Gens eine starke, wenn auch nicht vollständige Attenuierung der *P. berghei* Parasiten in der Leberphase bewirkte und somit die Voraussetzungen für eine Verwendung bei der Herstellung doppelt attenuierter *P. berghei* Parasiten erfüllte.

Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten attenuieren in der späten Leberphase und erzeugen eine sterile Protektion gegen eine Infektion mit voll-virulenten *P. berghei* Sporozoiten

Die doppelt attenuierten Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten entsprachen in den untersuchten Merkmalen weitgehend den PbPFO_{LS}-Parasiten. Allerdings war bei den Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten bereits 30 h nach Infektion ein größerer Anteil der Parasiten lysiert. Demnach hatte die doppelte Attenuierung einen stärkeren Effekt auf die Viabilität der Parasiten als die einfache Attenuierung durch PFO-Expression. Daraus ergibt sich die Frage, worin dieser stärkere Effekt begründet ist.

Die Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten exprimierten zum Zeitpunkt des Deletionseffektes bereits seit einigen Stunden PFO und über 60 % der Parasiten wiesen eine perforierte PVM auf. Dementsprechend ist es unwahrscheinlich, dass eine durch die Pbpdh-e1α-Gendeletion verursachte Beeinträchtigung des FAS-II-Wegs einen direkten Einfluss auf die PFO-vermittelte PVM-Perforation hat. Falls die Enzyme des PDH-Komplexes bereits zu früheren Zeitpunkten in der Leberphase vorliegen, könnten diese möglicherweise an weiteren, nicht essentiellen Vorgängen im Parasiten beteiligt sein. So wird z.B. das vom PDH-Komplex gebildete Acetyl-CoA offensichtlich nicht ausschließlich für die Synthese neuer Fettsäuren verwendet (Olszewski et al., 2010). 40 h nach der Infektion lag aber kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Anzahl intakter PbPFO_{LS}- und Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten vor. Im Vergleich hierzu kam es bei den doppelt attenuierten P. falciparum p52 /p36 -Parasiten zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Leberphasenentwicklung im Vergleich zu den beiden einfach attenuierten Parasitenlinien (VanBuskirk et al., 2009). Zwar traten auch bei diesen doppelt attenuierten Parasiten keine breakthrough Infektionen auf, aber die Parasiten zeigten eine stark verringerte Persistenz in den Hepatozyten (VanBuskirk et al., 2009). Bei den mit Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten infizierten Zellen wurden weder in vitro noch in vivo abgelöste Zelle bzw. die Entstehung einer Blutinfektion beobachtet. Somit wurde bei den Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten offensichtlich ein höherer Grad der Attenuierung erreicht, als bei den PbPFO_{LS}- und Pbpdhe1α-Parasiten, die jeweils noch breakthrough Infektionen aufwiesen. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Herstellung sicherer attenuierter Parasiten anstelle von doppelter Gendeletion auch durch die Kombination von Toxinexpression und einer einfachen Gendeletion möglich ist.

Die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit drei Dosen von jeweils 5.000 Pbpdhko-PFO_{LS}-Sporozoiten schützte die Mäuse 30 Tage nach der letzten Immunisierung vor einer Infektion mit voll-virulenten Wildtypsporozoiten. In der Vergangenheit wurden verschiedene Immunisierungsstudien mit RAS durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass RAS, abhängig von der jeweils untersuchten Plasmodienspezies, bereits bei gleichen bzw. geringeren Immunisierungsdosen eine sterile Protektion erzeugen können (Chattopadhyay et al., 2009; Douradinha et al., 2007). Aktuelle Studien mit GAPs machen jedoch deutlich, dass eine umfassendere, stadien- und speziesübergreifende Antwort vorwiegend mit in der späten Leberphase attenuierten Parasiten zu erreichen ist, die bereits Antigene der späten Leberphase und der Blutphase exprimieren (Butler et al., 2011).

Die genauere Charakterisierung der Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten *in vivo* und der damit verbundenen Immunantwort wird helfen, viele der nun aufkommenden Fragen zu beantworten:

Gibt es Unterschiede in der Immunantwort nach einer Immunisierung mit Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten im Vergleich zu anderen spät attenuierten GAPs und RAS? Sofern es Unterschiede gibt, worin bestehen diese? Wie weit entwickeln sich die Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten *in vivo* und wie lange persistieren die Parasiten in der Leber? Kommt es auch *in vivo* nicht zum Tod der Wirtszelle und stellt dieses eine "Verbesserung" gegenüber anderen GAPs dar?

Plasmodiumparasiten entwickeln sich während ihrer Leberphasenentwicklung in einer parasiphoren Vakuole. Hierdurch wird unter anderem verhindert, dass Parasitenproteine in größerem Umfang in das Wirtszellzytosol gelangen, wo sie prozessiert und anschließend auf der Zelloberfläche über MHC-Klasse-I-Komplexe präsentiert würden (Cockburn et al., 2011). Bei den PbPFO_{LS}-Parasiten hingegen gelangen nach der PVM/PPM-Perforation im großen Umfang Parasitenproteine in das Wirtszellzytosol, darunter auch Proteine der späten Schizonten. Es ist somit anzunehmen, dass in diesem Fall eine große Bandbreite an Parasitenantigenen von den Hepatozyten präsentiert wird. Um zu untersuchen, ob von PbPFO_{LS}-infizierten Zellen tatsächlich Antigene von Proteinen, die aus dem Parasitenzytosol stammen, präsentiert werden, wurde in Kooperation mit T. Jacobs (BNI, Hamburg) ein neuer Ansatz verfolgt. Es wurden transgene Parasiten hergestellt, die leberphasenspezifisch PFO und konstitutiv GFP als Fusionsprotein mit einem bekannten T-Zell-Epitop (PbOVA-GFP_{con}-PFO_{LS}) exprimieren. Als Kontrolle dienen Parasiten, die nur das OVA-GFP-Fusionsprotein aber kein PFO exprimieren (PbOVA-GFP_{con}). Mit Hilfe dieser Parasitenlinien kann zukünftig untersucht werden, ob die PFO-induzierte PVM/PPM-Ruptur zu einer verbesserten Antigenpräsentation bei den infizierten Zellen führt. So ist unter anderem geplant, die Reaktion von OVA-spezifischen T-Zellen gegenüber

PbOVA-GFP_{con}-PFO_{LS}- bzw. PbOVA-GFP_{con}-infizierter Wirtszellen zu analysieren. Werden PbOVA-GFP_{con}-PFO_{LS}-infizierte Zellen von den T-Zellen "erkannt", PbOVA-GFP_{con}-infizierte Zellen jedoch nicht, wäre das ein Hinweis darauf, dass durch die PFO-induzierte PVM/PPM-Ruptur OVA-GFP-Proteine in das Wirtszellzytosol gelangt und für die Antigenpräsentation prozessiert worden sind.

Ob und inwiefern dies letztlich zu einer verbesserten Protektion der immunisierten Tiere gegen einen *challenge* mit Wildtypparasiten führt, müssen weitere Immunisierungsexperimente im Vergleich mit früh (z.B. *uis3*) und anderen spät attenuierten Parasiten zeigen (z.B. *fabi*). Da sich die Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten bis ins Schizontenstadium entwickeln, ist anzunehmen, dass sie eine umfangreichere Protektion als früh attenuierte GAPs erzeugen, wie dies bereits mit spät attenuierten GAPs gezeigt wurde (Butler et al., 2011). In diesem Zusammenhang wird es ebenfalls interessant sein zu untersuchen, ob eine Immunisierung mit den in dieser Arbeit hergestellten doppelt attenuierten Parasiten Mäuse gegen eine Infektion mit Blutstadienparasiten (Kreuzstadienprotektion) schützen kann. Wie es genau zu dieser verbesserten Protektion, die durch spät attenuierte GAPs erzeugt wird, kommt, ist bisher nicht verstanden.

Zur Steigerung der Immunantwort bietet der Ansatz der Verwendung eines stadienspezifischen Promotors zu Attenuierungszwecken weiterhin die Möglichkeit, zusätzlich ektopisch stadienübergreifende Antigene zu exprimieren. Ebenso ist die zusätzliche Expression "natürlicher Wirkungsverstärker" denkbar, die die Immunantwort verstärken und somit vermutlich eine längeren und umfassenderen Impfschutz erzeugen (Borrmann and Matuschewski, 2011).

Hierbei stellt sich auch die Frage nach der Aktivierung (priming) zytotoxischer CD8+ T-Zellen. Obwohl Hepatozyten dazu in der Lage sind, T-Zellen zu primen, erfolgt das hauptsächliche priming sehr wahrscheinlich in den peripheren Lymphknoten nahe der Einstichstelle der Mücke (Cockburn et al., 2011; Hafalla et al., 2011). Das priming zytotoxischer T-Zellen gegen Antigene der späten Leberphase würde dementsprechend voraussetzen, dass sich die Parasiten außerhalb der Leber in exoerythrozytäre Stadien entwickeln. Dass diese Parasitenentwicklung in nicht-Leberzellen prinzipiell möglich ist, konnte bereits experimentell gezeigt werden (Coppi et al., 2011; Gueirard et al., 2010). Es wird erhofft, dass die PbOVA-GFPcon-PFOLS-Parasiten dabei helfen können, diese Vorgänge und die Grundlagen der erweiterten Immunantwort, die durch spät attenuierte Parasiten erzeugt wird, sowie die damit verbundene Präsentation von Antigenen später Leberstadien zu studieren.

Ein weiterer noch zu klärender Aspekt ist der Einfluss des Überlebens der Pbpdhko-PFO_{LS}-infizierten Wirtszellen auf den Impfschutz, sofern dieses auch in vivo zutrifft. In diesem Zusammenhang müsste auch untersucht werden, wie Parasitenantigene von den Pbpdhko-PFO_{LS}-infizierten Wirtszellen präsentiert werden. Fragen, ob eine längere Persistenz der Parasiten und eine damit verbundene "Hinauszögerung" bzw. Unterbindung der Wirtszellapoptose tatsächlich eine bessere Protektion erzeugt und ob eine längere Antigenpräsentation tatsächlich einen verbesserten Impfschutz vermittelt, wird in der Wissenschaft kontrovers diskutiert. Einige Wissenschaftler vermuten, dass eine längere Antigenpräsentation für eine breitere T-Zellantwort und für eine lang anhaltende Protektion notwendig ist. Auf der anderen Seite konnte mit früh attenuierten GAPs, die bereits nach kurzer Zeit entfernt wurden, eine mehrere Monate andauernde, sogar speziesübergreifende Protektion erreicht werden (Cockburn et al., 2010; Douradinha et al., 2007; Labaied et al., 2007; Mueller et al., 2007; Scheller and Azad, 1995; Tarun et al., 2007; van Dijk et al., 2005). Unterschiede in diesen Studien hinsichtlich der verwendeten Plasmodium-Spezies und Mausarten sowie der Immunisierungsschemata und Injektionswege erschweren hierbei die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Eine tiefer gehende Charakterisierung der Immunantwort gegen Pbpdhko-PFO_{LS}-Parasiten in verschiedenen Mausmodellen ist deshalb hinsichtlich der Entwicklung eines sicheren Malariaimpfstoffes von großer Bedeutung.

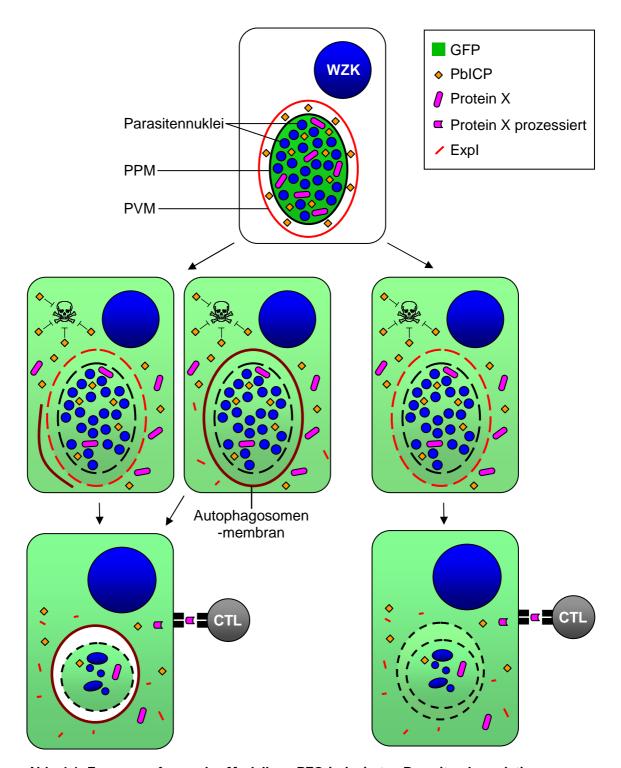


Abb. 4.1: Zusammenfassendes Modell zur PFO-induzierten Parasitendegradation

Bedingt durch die PFO-Expression kommt es zur Perforation der PVM und PPM (gestrichelte Linien). Hierduch kommt es zum Tod bzw. einer starken Schwächung des Parasiten. Der Parasit wird in einem Autophagosom isoliert und dann später degradiert, wobei sich das Autophagosom neu bilden kann (linke Seite) oder die PVM einfach umgebaut wird (mittleres Bild). Alternativ dazu kann der Parasit durch andere Prozesse abgebaut werden (rechte Seite). In allen Fällen gelangen aber Parasitenproteine wie z.B. PbICP in das Wirtszellzytosol. Dort werden die Parasitenproteine prozessiert und anschließend auf der Außenseite der Wirtszelle über MHC-Klasse-I-Komplexe den zytotoxischen T-Zellen (CTL) präsentiert. PbICP hemmt eine mögliche Wirtszellapoptose ("Totenkopf"). PVM-Proteine wie z.B. Expl werden ins Wirtszellzytosol freigesetzt. WZK: Wirtszellkern

5 Literaturverzeichnis

- Al-Olayan, E.M., Williams, G.T., and Hurd, H. (2002). Apoptosis in the malaria protozoan, Plasmodium berghei: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. International journal for parasitology *32*, 1133-1143.
- Aly, A.S., Mikolajczak, S.A., Rivera, H.S., Camargo, N., Jacobs-Lorena, V., Labaied, M., Coppens, I., and Kappe, S.H. (2008). Targeted deletion of SAP1 abolishes the expression of infectivity factors necessary for successful malaria parasite liver infection. Molecular microbiology *69*, 152-163.
- Amino, R., Giovannini, D., Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J.F., Prevost, M.C., Ishino, T., Yuda, M., and Menard, R. (2008). Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. Cell host & microbe 3, 88-96.
- Amino, R., Thiberge, S., Blazquez, S., Baldacci, P., Renaud, O., Shorte, S., and Menard, R. (2007). Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. Nature protocols *2*, 1705-1712.
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., and Menard, R. (2006). Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. Nature medicine *12*, 220-224.
- Aponte, J.J., Aide, P., Renom, M., Mandomando, I., Bassat, Q., Sacarlal, J., Manaca, M.N., Lafuente, S., Barbosa, A., Leach, A., et al. (2007). Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. Lancet *370*, 1543-1551.
- Arastu-Kapur, S., Ponder, E.L., Fonovic, U.P., Yeoh, S., Yuan, F., Fonovic, M., Grainger, M., Phillips, C.I., Powers, J.C., and Bogyo, M. (2008). Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature chemical biology *4*, 203-213.
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S.H., Schnieder, T., and Frevert, U. (2007a). Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. PLoS pathogens 3, e171.
- Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A.B., Jr., van Rooijen, N., Schnieder, T., and Frevert, U. (2007b). Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. Cellular microbiology *9*, 397-412.
- Bano, N., Romano, J.D., Jayabalasingham, B., and Coppens, I. (2007). Cellular interactions of Plasmodium liver stage with its host mammalian cell. International journal for parasitology *37*, 1329-1341.
- Bejon, P., Lusingu, J., Olotu, A., Leach, A., Lievens, M., Vekemans, J., Mshamu, S., Lang, T., Gould, J., Dubois, M.C., *et al.* (2008). Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. The New England journal of medicine *359*, 2521-2532.
- Belnoue, E., Costa, F.T., Frankenberg, T., Vigario, A.M., Voza, T., Leroy, N., Rodrigues, M.M., Landau, I., Snounou, G., and Renia, L. (2004). Protective T cell

immunity against malaria liver stage after vaccination with live sporozoites under chloroquine treatment. J Immunol 172, 2487-2495.

Belnoue, E., Voza, T., Costa, F.T., Gruner, A.C., Mauduit, M., Rosa, D.S., Depinay, N., Kayibanda, M., Vigario, A.M., Mazier, D., *et al.* (2008). Vaccination with live Plasmodium yoelii blood stage parasites under chloroquine cover induces cross-stage immunity against malaria liver stage. J Immunol *181*, 8552-8558.

Bhanot, P., Schauer, K., Coppens, I., and Nussenzweig, V. (2005). A surface phospholipase is involved in the migration of plasmodium sporozoites through cells. The Journal of biological chemistry *280*, 6752-6760.

Blackman, M.J. (2008). Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade. Cellular microbiology 10, 1925-1934.

Borrmann, S., and Matuschewski, K. (2011). Targeting Plasmodium liver stages: better late than never. Trends in molecular medicine.

Bruchhaus, I., Roeder, T., Rennenberg, A., and Heussler, V.T. (2007). Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. Trends in parasitology 23, 376-383.

Bull, P.C., Lowe, B.S., Kortok, M., Molyneux, C.S., Newbold, C.I., and Marsh, K. (1998). Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. Nature medicine *4*, 358-360.

Butler, N.S., Schmidt, N.W., Vaughan, A.M., Aly, A.S., Kappe, S.H., and Harty, J.T. (2011). Superior antimalarial immunity after vaccination with late liver stage-arresting genetically attenuated parasites. Cell host & microbe *9*, 451-462.

Carlton, J.M., Adams, J.H., Silva, J.C., Bidwell, S.L., Lorenzi, H., Caler, E., Crabtree, J., Angiuoli, S.V., Merino, E.F., Amedeo, P., *et al.* (2008). Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. Nature *455*, 757-763.

Carlton, J.M., Angiuoli, S.V., Suh, B.B., Kooij, T.W., Pertea, M., Silva, J.C., Ermolaeva, M.D., Allen, J.E., Selengut, J.D., Koo, H.L., *et al.* (2002). Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite Plasmodium yoelii yoelii. Nature *419*, 512-519.

Carrolo, M., Giordano, S., Cabrita-Santos, L., Corso, S., Vigario, A.M., Silva, S., Leiriao, P., Carapau, D., Armas-Portela, R., Comoglio, P.M., *et al.* (2003). Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. Nature medicine *9*, 1363-1369.

Casares, S., Brumeanu, T.D., and Richie, T.L. (2010). The RTS,S malaria vaccine. Vaccine 28, 4880-4894.

Casares, S., and Richie, T.L. (2009). Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. Current opinion in immunology *21*, 321-330.

CDC (2011a). Malaria. CDC Website, http://www.cdc.gov/malaria/.

CDC (2011b). Malaria. CDC Website, http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-2013-infectious-diseases-related-to-travel/malaria.htm#1975.

Chakravarty, S., Cockburn, I.A., Kuk, S., Overstreet, M.G., Sacci, J.B., and Zavala, F. (2007). CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skindraining lymph nodes. Nature medicine *13*, 1035-1041.

Chattopadhyay, R., Conteh, S., Li, M., James, E.R., Epstein, J.E., and Hoffman, S.L. (2009). The Effects of radiation on the safety and protective efficacy of an attenuated Plasmodium yoelii sporozoite malaria vaccine. Vaccine *27*, 3675-3680.

Clyde, D.F. (1975). Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. The American journal of tropical medicine and hygiene *24*, 397-401.

Cockburn, I.A., Chen, Y.C., Overstreet, M.G., Lees, J.R., van Rooijen, N., Farber, D.L., and Zavala, F. (2010). Prolonged antigen presentation is required for optimal CD8+ T cell responses against malaria liver stage parasites. PLoS pathogens *6*, e1000877.

Cockburn, I.A., Tse, S.W., Radtke, A.J., Srinivasan, P., Chen, Y.C., Sinnis, P., and Zavala, F. (2011). Dendritic cells and hepatocytes use distinct pathways to process protective antigen from plasmodium in vivo. PLoS pathogens *7*, e1001318.

Cohen, J., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R., Vekemans, J., and Leach, A. (2010). From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. Human vaccines *6*, 90-96.

Coppi, A., Natarajan, R., Pradel, G., Bennett, B.L., James, E.R., Roggero, M.A., Corradin, G., Persson, C., Tewari, R., and Sinnis, P. (2011). The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. The Journal of experimental medicine *208*, 341-356.

Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J.R., Bennett, B.L., Lawrence, R., Esko, J.D., Billker, O., and Sinnis, P. (2007). Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. Cell host & microbe 2, 316-327.

Cowman, A.F., and Crabb, B.S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell *124*, 755-766.

Cox-Singh, J., and Singh, B. (2008). Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? Trends in parasitology *24*, 406-410.

Crabb, B.S., Triglia, T., Waterkeyn, J.G., and Cowman, A.F. (1997). Stable transgene expression in Plasmodium falciparum. Molecular and biochemical parasitology *90*, 131-144.

Crompton, P.D., Pierce, S.K., and Miller, L.H. (2010). Advances and challenges in malaria vaccine development. The Journal of clinical investigation *120*, 4168-4178.

Doolan, D.L., and Hoffman, S.L. (2000). The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. J Immunol *165*, 1453-1462.

Douradinha, B., van Dijk, M.R., Ataide, R., van Gemert, G.J., Thompson, J., Franetich, J.F., Mazier, D., Luty, A.J., Sauerwein, R., Janse, C.J., *et al.* (2007). Genetically attenuated P36p-deficient Plasmodium berghei sporozoites confer long-lasting and partial cross-species protection. International journal for parasitology *37*, 1511-1519.

Falae, A., Combe, A., Amaladoss, A., Carvalho, T., Menard, R., and Bhanot, P. (2010). Role of Plasmodium berghei cGMP-dependent protein kinase in late liver stage development. The Journal of biological chemistry *285*, 3282-3288.

Fang, W., Vega-Rodriguez, J., Ghosh, A.K., Jacobs-Lorena, M., Kang, A., and St Leger, R.J. (2011). Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. Science (New York, NY *331*, 1074-1077.

Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L., and Yee, H. (2005). Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver. PLoS biology *3*, e192.

Frevert, U., Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B., and Nussenzweig, V. (1993). Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. The Journal of experimental medicine *177*, 1287-1298.

Friesen, J., and Matuschewski, K. (2011). Comparative efficacy of pre-erythrocytic whole organism vaccine strategies against the malaria parasite. Vaccine.

Garcia, L.S. (2010). Malaria. Clinics in laboratory medicine *30*, 93-129.

Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., *et al.* (2002). Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature *419*, 498-511.

Gelhaus, C., Jacobs, T., Andra, J., and Leippe, M. (2008). The antimicrobial peptide NK-2, the core region of mammalian NK-lysin, kills intraerythrocytic Plasmodium falciparum. Antimicrobial agents and chemotherapy *52*, 1713-1720.

Ghosh, A., Edwards, M.J., and Jacobs-Lorena, M. (2000). The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. Parasitology today (Personal ed 16. 196-201.

Ghosh, A.K., and Jacobs-Lorena, M. (2009). Plasmodium sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. Current opinion in microbiology *12*, 394-400.

Graewe, S., Rankin, K.E., Lehmann, C., Deschermeier, C., Hecht, L., Froehlke, U., Stanway, R.R., and Heussler, V. (2011). Hostile Takeover by Plasmodium: Reorganization of Parasite and Host Cell Membranes During Liver Stage Egress. PLoS pathogens, accepted manuscript.

Greenwood, B.M., Fidock, D.A., Kyle, D.E., Kappe, S.H., Alonso, P.L., Collins, F.H., and Duffy, P.E. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. The Journal of clinical investigation *118*, 1266-1276.

Gueirard, P., Tavares, J., Thiberge, S., Bernex, F., Ishino, T., Milon, G., Franke-Fayard, B., Janse, C.J., Menard, R., and Amino, R. (2010). Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 18640-18645.

Hafalla, J.C., Silvie, O., and Matuschewski, K. (2011). Cell biology and immunology of malaria. Immunological reviews *240*, 297-316.

Haldar, K., Mohandas, N., Samuel, B.U., Harrison, T., Hiller, N.L., Akompong, T., and Cheresh, P. (2002). Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. Cellular microbiology *4*, 383-395.

Hall, N., Karras, M., Raine, J.D., Carlton, J.M., Kooij, T.W., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C.S., Pain, A., Christophides, G.K., *et al.* (2005). A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. Science (New York, NY *307*, 82-86.

Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006). Listeria monocytogenes: a multifaceted model. Nat Rev Microbiol *4*, 423-434.

Helm, S., Lehmann, C., Nagel, A., Stanway, R.R., Horstmann, S., Llinas, M., and Heussler, V.T. (2010). Identification and characterization of a liver stage-specific promoter region of the malaria parasite Plasmodium. PloS one *5*, e13653.

Heuck, A.P., Savva, C.G., Holzenburg, A., and Johnson, A.E. (2007). Conformational changes that effect oligomerization and initiate pore formation are triggered throughout perfringolysin O upon binding to cholesterol. The Journal of biological chemistry *282*, 22629-22637.

Heussler, V., Rennenberg, A., and Stanway, R. (2010). Host cell death induced by the egress of intracellular Plasmodium parasites. Apoptosis *15*, 376-385.

Hoffman, S.L., Goh, L.M., Luke, T.C., Schneider, I., Le, T.P., Doolan, D.L., Sacci, J., de la Vega, P., Dowler, M., Paul, C., *et al.* (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites. The Journal of infectious diseases *185*, 1155-1164.

Horrocks, P., and Muhia, D. (2005). Pexel/VTS: a protein-export motif in erythrocytes infected with malaria parasites. Trends in parasitology *21*, 396-399.

Horstmann, S. (2008). Identifikation des Leberphasen-spezifisch exprimierten Proteins PbLSA4 von Plasmodium berghei (Vincke & Lips, 1948) und Charakterisierung des pblsa4-Promotorbereichs (Dissertation).

Hviid, L. (2010). The role of Plasmodium falciparum variant surface antigens in protective immunity and vaccine development. Human vaccines *6*, 84-89.

Ishino, T., Boisson, B., Orito, Y., Lacroix, C., Bischoff, E., Loussert, C., Janse, C., Menard, R., Yuda, M., and Baldacci, P. (2009). LISP1 is important for the egress of Plasmodium berghei parasites from liver cells. Cellular microbiology *11*, 1329-1339.

Ishino, T., Chinzei, Y., and Yuda, M. (2005a). A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. Cellular microbiology *7*, 199-208.

Ishino, T., Chinzei, Y., and Yuda, M. (2005b). Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. Molecular microbiology *58*, 1264-1275.

Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y., and Yuda, M. (2004). Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. PLoS biology 2, E4.

- Jacobs, T., Bruhn, H., Gaworski, I., Fleischer, B., and Leippe, M. (2003). NK-lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against Trypanosoma cruzi. Antimicrobial agents and chemotherapy *47*, 607-613.
- Janse, C.J., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., and Waters, A.P. (2006a). High efficiency transfection of Plasmodium berghei facilitates novel selection procedures. Molecular and biochemical parasitology *145*, 60-70.
- Janse, C.J., Ramesar, J., and Waters, A.P. (2006b). High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei. Nature protocols *1*, 346-356.
- Jobe, O., Lumsden, J., Mueller, A.K., Williams, J., Silva-Rivera, H., Kappe, S.H., Schwenk, R.J., Matuschewski, K., and Krzych, U. (2007). Genetically attenuated Plasmodium berghei liver stages induce sterile protracted protection that is mediated by major histocompatibility complex Class I-dependent interferon-gamma-producing CD8+ T cells. The Journal of infectious diseases *196*, 599-607.
- Jones, S., and Portnoy, D.A. (1994). Characterization of Listeria monocytogenes pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. Infection and immunity *62*, 5608-5613.
- Jones, S., Preiter, K., and Portnoy, D.A. (1996). Conversion of an extracellular cytolysin into a phagosome-specific lysin which supports the growth of an intracellular pathogen. Molecular microbiology *21*, 1219-1225.
- Kadota, K., Ishino, T., Matsuyama, T., Chinzei, Y., and Yuda, M. (2004). Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 16310-16315.
- Kafsack, B.F., and Carruthers, V.B. (2010). Apicomplexan perforin-like proteins. Communicative & integrative biology *3*, 18-23.
- Kafsack, B.F., Pena, J.D., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J.C., and Carruthers, V.B. (2009). Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. Science (New York, NY 323, 530-533.
- Kaiser, K., Camargo, N., Coppens, I., Morrisey, J.M., Vaidya, A.B., and Kappe, S.H. (2004). A member of a conserved Plasmodium protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. Molecular and biochemical parasitology *133*, 15-26.
- Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., and Menard, R. (1999). Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. The Journal of cell biology *147*, 937-944.
- Kappe, S.H., Vaughan, A.M., Boddey, J.A., and Cowman, A.F. (2010). That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda. Science (New York, NY 328, 862-866.
- Kariu, T., Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y., and Yuda, M. (2006). CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. Molecular microbiology *59*, 1369-1379.

Karnasuta, C., Pavanand, K., Chantakulkij, S., Luttiwongsakorn, N., Rassamesoraj, M., Laohathai, K., Webster, H.K., and Watt, G. (1995). Complete development of the liver stage of Plasmodium falciparum in a human hepatoma cell line. The American journal of tropical medicine and hygiene *53*, 607-611.

Khan, F., Tang, J., Qin, C.L., and Kim, K. (2002). Cyclin-dependent kinase TPK2 is a critical cell cycle regulator in Toxoplasma gondii. Molecular microbiology *45*, 321-332.

Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. Autophagy 3, 452-460.

Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S.E., and Sachs, J. (2004). A global index representing the stability of malaria transmission. The American journal of tropical medicine and hygiene *70*, 486-498.

Klotz, C., and Frevert, U. (2008). Plasmodium yoelii sporozoites modulate cytokine profile and induce apoptosis in murine Kupffer cells. International journal for parasitology 38, 1639-1650.

Krishnegowda, G., Hajjar, A.M., Zhu, J., Douglass, E.J., Uematsu, S., Akira, S., Woods, A.S., and Gowda, D.C. (2005). Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. The Journal of biological chemistry *280*, 8606-8616.

Kumar, K.A., Garcia, C.R., Chandran, V.R., Van Rooijen, N., Zhou, Y., Winzeler, E., and Nussenzweig, V. (2007). Exposure of Plasmodium sporozoites to the intracellular concentration of potassium enhances infectivity and reduces cell passage activity. Molecular and biochemical parasitology *156*, 32-40.

Labaied, M., Harupa, A., Dumpit, R.F., Coppens, I., Mikolajczak, S.A., and Kappe, S.H. (2007). Plasmodium yoelii sporozoites with simultaneous deletion of P52 and P36 are completely attenuated and confer sterile immunity against infection. Infection and immunity *75*, 3758-3768.

Leiriao, P., Albuquerque, S.S., Corso, S., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Rodriguez, A., Giordano, S., and Mota, M.M. (2005a). HGF/MET signalling protects Plasmodium-infected host cells from apoptosis. Cellular microbiology *7*, 603-609.

Leiriao, P., Mota, M.M., and Rodriguez, A. (2005b). Apoptotic Plasmodium-infected hepatocytes provide antigens to liver dendritic cells. The Journal of infectious diseases 191, 1576-1581.

Ligeon, L.A., Temime-Smaali, N., and Lafont, F. (2011). Ubiquitylation and autophagy in the control of bacterial infections and related inflammatory responses. Cellular microbiology *13*, 1303-1311.

Luke, T.C., and Hoffman, S.L. (2003). Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoite vaccine. The Journal of experimental biology *206*, 3803-3808.

Lumsden, J.M., Schwenk, R.J., Rein, L.E., Moris, P., Janssens, M., Ofori-Anyinam, O., Cohen, J., Kester, K.E., Heppner, D.G., and Krzych, U. (2011). Protective Immunity

Induced with the RTS,S/AS Vaccine Is Associated with IL-2 and TNF-alpha Producing Effector and Central Memory CD4 T Cells. PloS one *6*, e20775.

Maier, A.G., Cooke, B.M., Cowman, A.F., and Tilley, L. (2009). Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. Nat Rev Microbiol *7*, 341-354.

Matuschewski, K., and Mueller, A.K. (2007). Vaccines against malaria - an update. The FEBS journal *274*, 4680-4687.

Matuschewski, K., and Schuler, H. (2008). Actin/myosin-based gliding motility in apicomplexan parasites. Sub-cellular biochemistry 47, 110-120.

McRobert, L., Taylor, C.J., Deng, W., Fivelman, Q.L., Cummings, R.M., Polley, S.D., Billker, O., and Baker, D.A. (2008). Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. PLoS biology *6*, e139.

Medica, D.L., and Sinnis, P. (2005). Quantitative dynamics of Plasmodium yoelii sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. Infection and immunity 73, 4363-4369.

Menard, R. (2000). The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. Microbes and infection / Institut Pasteur 2, 633-642.

Mikolajczak, S.A., Sacci Jr, J.B., De La Vega, P., Camargo, N., Vanbuskirk, K., Krzych, U., Cao, J., Jacobs-Lorena, M., Cowman, A.F., and Kappe, S.H. (2011). Disruption of the Plasmodium falciparum liver-stage antigen-1 locus causes a differentiation defect in late liver-stage parasites. Cellular microbiology *13*, 1250-1260.

Miller, L.H., Good, M.F., and Milon, G. (1994). Malaria pathogenesis. Science (New York, NY 264, 1878-1883.

Mitchell, G.H., Thomas, A.W., Margos, G., Dluzewski, A.R., and 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*, 154-158.

Mota, M.M., Hafalla, J.C., and Rodriguez, A. (2002). Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. Nature medicine *8*, 1318-1322.

Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., and Rodriguez, A. (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. Science (New York, NY *291*, 141-144.

Mueller, A.K., Camargo, N., Kaiser, K., Andorfer, C., Frevert, U., Matuschewski, K., and Kappe, S.H. (2005a). Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 3022-3027.

Mueller, A.K., Deckert, M., Heiss, K., Goetz, K., Matuschewski, K., and Schluter, D. (2007). Genetically attenuated Plasmodium berghei liver stages persist and elicit sterile protection primarily via CD8 T cells. The American journal of pathology *171*, 107-115.

Mueller, A.K., Labaied, M., Kappe, S.H., and Matuschewski, K. (2005b). Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine. Nature 433, 164-167.

Najera, J.A., Gonzalez-Silva, M., and Alonso, P.L. (2011). Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955-1969). PLoS medicine 8, e1000412.

Nelson, L.D., Johnson, A.E., and London, E. (2008). How interaction of perfringolysin O with membranes is controlled by sterol structure, lipid structure, and physiological low pH: insights into the origin of perfringolysin O-lipid raft interaction. The Journal of biological chemistry *283*, 4632-4642.

Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H., and Orton, C. (1967). Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. Nature *216*, 160-162.

Nussenzweig, V., and Nussenzweig, R. (1986a). Experimental basis for the development of a synthetic vaccine against Plasmodium falciparum malaria sporozoites. Ciba Foundation symposium *119*, 150-163.

Nussenzweig, V., and Nussenzweig, R.S. (1986b). Development of a sporozoite malaria vaccine. The American journal of tropical medicine and hygiene *35*, 678-688.

O'Brien, D.K., and Melville, S.B. (2004). Effects of Clostridium perfringens alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of C. perfringens in host tissues. Infection and immunity *7*2, 5204-5215.

Ocana-Morgner, C., Mota, M.M., and Rodriguez, A. (2003). Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. The Journal of experimental medicine *197*, 143-151.

Ocana-Morgner, C., Wong, K.A., Lega, F., Dotor, J., Borras-Cuesta, F., and Rodriguez, A. (2007). Role of TGF-beta and PGE2 in T cell responses during Plasmodium yoelii infection. European journal of immunology *37*, 1562-1574.

Olszewski, K.L., Mather, M.W., Morrisey, J.M., Garcia, B.A., Vaidya, A.B., Rabinowitz, J.D., and Llinas, M. (2010). Branched tricarboxylic acid metabolism in Plasmodium falciparum. Nature *466*, 774-778.

Orengo, J.M., Wong, K.A., Ocana-Morgner, C., and Rodriguez, A. (2008). A Plasmodium yoelii soluble factor inhibits the phenotypic maturation of dendritic cells. Malaria journal *7*, 254.

Overstreet, M.G., Cockburn, I.A., Chen, Y.C., and Zavala, F. (2008). Protective CD8 T cells against Plasmodium liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response. Immunological reviews *225*, 272-283.

Pandey, A.V., Tekwani, B.L., Singh, R.L., and Chauhan, V.S. (1999). Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. The Journal of biological chemistry *274*, 19383-19388.

Pandey, K.C., Singh, N., Arastu-Kapur, S., Bogyo, M., and Rosenthal, P.J. (2006). Falstatin, a cysteine protease inhibitor of Plasmodium falciparum, facilitates erythrocyte invasion. PLoS pathogens *2*, e117.

Pei, Y., Tarun, A.S., Vaughan, A.M., Herman, R.W., Soliman, J.M., Erickson-Wayman, A., and Kappe, S.H. (2010). Plasmodium pyruvate dehydrogenase activity is only

essential for the parasite's progression from liver infection to blood infection. Molecular microbiology *75*, 957-971.

Pinzon-Ortiz, C., Friedman, J., Esko, J., and Sinnis, P. (2001). The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for plasmodium sporozoite attachment to target cells. The Journal of biological chemistry 276, 26784-26791.

Portnoy, D.A., Tweten, R.K., Kehoe, M., and Bielecki, J. (1992). Capacity of listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of Bacillus subtilis within mammalian cells. Infection and immunity *60*, 2710-2717.

Pradel, G., and Frevert, U. (2001). Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. Hepatology (Baltimore, Md 33, 1154-1165.

Pradel, G., Garapaty, S., and Frevert, U. (2002). Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. Molecular microbiology *45*, 637-651.

Prudencio, M., Rodriguez, A., and Mota, M.M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. Nat Rev Microbiol *4*, 849-856.

Putrianti, E.D., Schmidt-Christensen, A., Arnold, I., Heussler, V.T., Matuschewski, K., and Silvie, O. (2010). The Plasmodium serine-type SERA proteases display distinct expression patterns and non-essential in vivo roles during life cycle progression of the malaria parasite. Cellular microbiology *12*, 725-739.

Raghavendra, K., Barik, T.K., Reddy, B.P., Sharma, P., and Dash, A.P. (2011). Malaria vector control: from past to future. Parasitology research *108*, 757-779.

Rautou, P.E., Mansouri, A., Lebrec, D., Durand, F., Valla, D., and Moreau, R. (2010). Autophagy in liver diseases. Journal of hepatology *53*, 1123-1134.

Rennenberg, A., Lehmann, C., Heitmann, A., Witt, T., Hansen, G., Nagarajan, K., Deschermeier, C., Turk, V., Hilgenfeld, R., and Heussler, V.T. (2010). Exoerythrocytic Plasmodium parasites secrete a cysteine protease inhibitor involved in sporozoite invasion and capable of blocking cell death of host hepatocytes. PLoS pathogens *6*, e1000825.

Roestenberg, M., Teirlinck, A.C., McCall, M.B., Teelen, K., Makamdop, K.N., Wiersma, J., Arens, T., Beckers, P., van Gemert, G., van de Vegte-Bolmer, M., *et al.* (2011). Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. Lancet *377*, 1770-1776.

Roiko, M.S., and Carruthers, V.B. (2009). New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. Cellular microbiology *11*, 1444-1452.

Rosado, C.J., Kondos, S., Bull, T.E., Kuiper, M.J., Law, R.H., Buckle, A.M., Voskoboinik, I., Bird, P.I., Trapani, J.A., Whisstock, J.C., *et al.* (2008). The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. Cellular microbiology *10*, 1765-1774.

Rosenthal, P.J., and Meshnick, S.R. (1996). Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. Molecular and biochemical parasitology *83*, 131-139.

Rossjohn, J., Feil, S.C., McKinstry, W.J., Tweten, R.K., and Parker, M.W. (1997). Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. Cell *89*, 685-692.

Salmon, B.L., Oksman, A., and Goldberg, D.E. (2001). Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 271-276.

Scheller, L.F., and Azad, A.F. (1995). Maintenance of protective immunity against malaria by persistent hepatic parasites derived from irradiated sporozoites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 4066-4068.

Scheller, L.F., Wirtz, R.A., and Azad, A.F. (1994). Susceptibility of different strains of mice to hepatic infection with Plasmodium berghei. Infection and immunity *62*, 4844-4847.

Schmidt-Christensen, A., Sturm, A., Horstmann, S., and Heussler, V.T. (2008). Expression and processing of Plasmodium berghei SERA3 during liver stages. Cellular microbiology *10*, 1723-1734.

Sedegah, M., Weiss, W.W., and Hoffman, S.L. (2007). Cross-protection between attenuated Plasmodium berghei and P. yoelii sporozoites. Parasite immunology 29, 559-565.

Shakibaei, M., and Frevert, U. (1996). Dual interaction of the malaria circumsporozoite protein with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and heparan sulfate proteoglycans. The Journal of experimental medicine *184*, 1699-1711.

Sidjanski, S., and Vanderberg, J.P. (1997). Delayed migration of Plasmodium sporozoites from the mosquito bite site to the blood. The American journal of tropical medicine and hygiene *57*, 426-429.

Silvie, O., Franetich, J.F., Charrin, S., Mueller, M.S., Siau, A., Bodescot, M., Rubinstein, E., Hannoun, L., Charoenvit, Y., Kocken, C.H., *et al.* (2004). A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites. The Journal of biological chemistry *279*, 9490-9496.

Silvie, O., Goetz, K., and Matuschewski, K. (2008). A sporozoite asparagine-rich protein controls initiation of Plasmodium liver stage development. PLoS pathogens *4*, e1000086.

Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.F., Prenant, M., Belnoue, E., Renia, L., Hannoun, L., Eling, W., Levy, S., Boucheix, C., et al. (2003). Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. Nature medicine 9, 93-96.

Silvie, O., Semblat, J.P., Franetich, J.F., Hannoun, L., Eling, W., and Mazier, D. (2002). Effects of irradiation on Plasmodium falciparum sporozoite hepatic development: implications for the design of pre-erythrocytic malaria vaccines. Parasite immunology 24, 221-223.

- Simmons, D., Woollett, G., Bergin-Cartwright, M., Kay, D., and Scaife, J. (1987). A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte. The EMBO journal *6*, 485-491.
- Singh, A.P., Buscaglia, C.A., Wang, Q., Levay, A., Nussenzweig, D.R., Walker, J.R., Winzeler, E.A., Fujii, H., Fontoura, B.M., and Nussenzweig, V. (2007). Plasmodium circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. Cell *131*, 492-504.
- Soltani, C.E., Hotze, E.M., Johnson, A.E., and Tweten, R.K. (2007). Specific protein-membrane contacts are required for prepore and pore assembly by a cholesterol-dependent cytolysin. The Journal of biological chemistry *282*, 15709-15716.
- Southern, J.A., Young, D.F., Heaney, F., Baumgartner, W.K., and Randall, R.E. (1991). Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. The Journal of general virology 72 (Pt 7), 1551-1557.
- Stanway, R.R., Mueller, N., Zobiak, B., Graewe, S., Froehlke, U., Zessin, P.J., Aepfelbacher, M., and Heussler, V.T. (2011). Organelle segregation into Plasmodium liver stage merozoites. Cellular microbiology.
- Stanway, R.R., Witt, T., Zobiak, B., Aepfelbacher, M., and Heussler, V.T. (2009). GFP-targeting allows visualization of the apicoplast throughout the life cycle of live malaria parasites. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization *101*, 415-430, 415 p following 430.
- Stewart, M.J., and Vanderberg, J.P. (1991). Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. The Journal of protozoology *38*, 411-421.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.M., Menard, R., and Heussler, V.T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. Science (New York, NY *313*, 1287-1290.
- Sturm, A., Graewe, S., Franke-Fayard, B., Retzlaff, S., Bolte, S., Roppenser, B., Aepfelbacher, M., Janse, C., and Heussler, V. (2009). Alteration of the parasite plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane during exo-erythrocytic development of malaria parasites. Protist *160*, 51-63.
- Sturm, A., and Heussler, V. (2007). Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic Plasmodium parasites. Medical microbiology and immunology 196, 127-133.
- Suhrbier, A., Winger, L.A., Castellano, E., and Sinden, R.E. (1990). Survival and antigenic profile of irradiated malarial sporozoites in infected liver cells. Infection and immunity *58*, 2834-2839.
- Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S., and Menard, R. (1997). TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. Cell *90*, 511-522.
- Tarun, A.S., Dumpit, R.F., Camargo, N., Labaied, M., Liu, P., Takagi, A., Wang, R., and Kappe, S.H. (2007). Protracted sterile protection with Plasmodium yoelii pre-

erythrocytic genetically attenuated parasite malaria vaccines is independent of significant liver-stage persistence and is mediated by CD8+ T cells. The Journal of infectious diseases 196, 608-616.

Tarun, A.S., Peng, X., Dumpit, R.F., Ogata, Y., Silva-Rivera, H., Camargo, N., Daly, T.M., Bergman, L.W., and Kappe, S.H. (2008). A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 305-310.

Tarun, A.S., Vaughan, A.M., and Kappe, S.H. (2009). Redefining the role of de novo fatty acid synthesis in Plasmodium parasites. Trends in parasitology *25*, 545-550.

Taylor, H.M., McRobert, L., Grainger, M., Sicard, A., Dluzewski, A.R., Hopp, C.S., Holder, A.A., and Baker, D.A. (2010). The malaria parasite cyclic GMP-dependent protein kinase plays a central role in blood-stage schizogony. Eukaryotic cell *9*, 37-45.

Tilley, S.J., and Saibil, H.R. (2006). The mechanism of pore formation by bacterial toxins. Current opinion in structural biology *16*, 230-236.

Tooze, S.A., and Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. Nature cell biology *12*, 831-835.

Turner, G. (1997). Cerebral malaria. Brain pathology (Zurich, Switzerland) 7, 569-582.

Tweten, R.K. (1988). Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O (theta-toxin) from Clostridium perfringens: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin. Infection and immunity *56*, 3235-3240.

Usynin, I., Klotz, C., and Frevert, U. (2007). Malaria circumsporozoite protein inhibits the respiratory burst in Kupffer cells. Cellular microbiology *9*, 2610-2628.

van de Sand, C., Horstmann, S., Schmidt, A., Sturm, A., Bolte, S., Krueger, A., Lutgehetmann, M., Pollok, J.M., Libert, C., and Heussler, V.T. (2005). The liver stage of Plasmodium berghei inhibits host cell apoptosis. Molecular microbiology *58*, 731-742.

van Dijk, M.R., Douradinha, B., Franke-Fayard, B., Heussler, V., van Dooren, M.W., van Schaijk, B., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Mota, M.M., Waters, A.P., et al. (2005). Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 12194-12199.

van Dooren, G.G., Reiff, S.B., Tomova, C., Meissner, M., Humbel, B.M., and Striepen, B. (2009). A novel dynamin-related protein has been recruited for apicoplast fission in Toxoplasma gondii. Curr Biol *19*, 267-276.

van Schaijk, B.C., Janse, C.J., van Gemert, G.J., van Dijk, M.R., Gego, A., Franetich, J.F., van de Vegte-Bolmer, M., Yalaoui, S., Silvie, O., Hoffman, S.L., *et al.* (2008). Gene disruption of Plasmodium falciparum p52 results in attenuation of malaria liver stage development in cultured primary human hepatocytes. PloS one *3*, e3549.

VanBuskirk, K.M., O'Neill, M.T., De La Vega, P., Maier, A.G., Krzych, U., Williams, J., Dowler, M.G., Sacci, J.B., Jr., Kangwanrangsan, N., Tsuboi, T., *et al.* (2009). Preerythrocytic, live-attenuated Plasmodium falciparum vaccine candidates by design. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 13004-13009.

Vanderberg, J.P. (2009). Reflections on early malaria vaccine studies, the first successful human malaria vaccination, and beyond. Vaccine 27, 2-9.

Vanderberg, J.P., and Frevert, U. (2004). Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of Plasmodium berghei sporozoites injected into skin by mosquitoes. International journal for parasitology *34*, 991-996.

Vanderberg, J.P., Nussenzweig, R.S., Most, H., and Orton, C.G. (1968). Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of Plasmodium berghei. II. Effects of radiation on sporozoites. The Journal of parasitology *54*, 1175-1180.

Vaughan, A.M., O'Neill, M.T., Tarun, A.S., Camargo, N., Phuong, T.M., Aly, A.S., Cowman, A.F., and Kappe, S.H. (2009a). Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development. Cellular microbiology *11*, 506-520.

Vaughan, A.M., Wang, R., and Kappe, S.H. (2009b). Genetically engineered, attenuated whole-cell vaccine approaches for malaria. Human vaccines *6*, 107-113.

Vincke, I.H., and Lips, M. (1948). Un nouveau plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo Plasmodium berghei n. sp. Annales de la Societe belge de medecine tropicale 28, 97-104.

Wang, Y., Weiss, L.M., and Orlofsky, A. (2009). Host cell autophagy is induced by Toxoplasma gondii and contributes to parasite growth. The Journal of biological chemistry *284*, 1694-1701.

WHO (2010a). Economic costs of malaria. Roll back malaria website, http://www.rollbackmalaria.org/cmc_upload/0/000/015/363/RBMInfosheet_010.pdf.

WHO (2010b). Fact Sheet Malaria. WHO website, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/.

Yamauchi, L.M., Coppi, A., Snounou, G., and Sinnis, P. (2007). Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. Cellular microbiology *9*, 1215-1222.

Yeoh, S., O'Donnell, R.A., Koussis, K., Dluzewski, A.R., Ansell, K.H., Osborne, S.A., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G.H., Bannister, L.H., *et al.* (2007). Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. Cell *131*, 1072-1083.

Yu, M., Kumar, T.R., Nkrumah, L.J., Coppi, A., Retzlaff, S., Li, C.D., Kelly, B.J., Moura, P.A., Lakshmanan, V., Freundlich, J.S., *et al.* (2008). The fatty acid biosynthesis enzyme Fabl plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites. Cell host & microbe *4*, 567-578.

Zhao, Y.O., Khaminets, A., Hunn, J.P., and Howard, J.C. (2009). Disruption of the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole by IFNgamma-inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. PLoS pathogens *5*, e1000288.

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Volker Heussler und Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus für die bereitwillige Übernahme des Referats und Koreferats.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Volker Heussler für die Themenstellung, die anregenden Diskussionen, die Möglichkeit zur selbständigen Arbeit und Projektgestaltung sowie die sehr gute Betreuung meiner Doktorarbeit.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Dr. Susanne Tartz und PD Dr. Thomas Jacobs für die hilfreichen Anregungen sowie für die Unterstützung bei den immunologischen Experimenten bedanken.

Weiterhin danke ich Dr. Holger Rohde (UKE, Hamburg) für die Bereitstellung der *C. perfringens* Bakterien.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Heussler für die tolle Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Dieser Dank gilt ebenso den Kolleginnen und Kollegen aus den Nachbarlaboren. Ich danke Dr. Christina Deschermeier für die Korrektur meiner Arbeit und die konstruktive Kritik. Vielen Dank an Susanne Helm für die hervorragende Zusammenarbeit und die lustige Zeit im Labor.

Ein großer Dank geht an meine Familie, meine Freunde und besonders an meine Freundin für ihr großes Verständnis und die Unterstützung in allen Höhen und Tiefen.