

Funktionale Charakterisierung Invasions-relevanter Proteine hinsichtlich ihrer Rolle während der Invasion und dem Zusammenhang zur sexuellen Entwicklung von *P. falciparum*

Dissertation

zur Erlangung der Würde des
Doktors der Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

angefertigt am Centre for Structural Systems Biology

vorgelegt von

Sabrina Bielfeld

Hamburg, April 2024

Für meine Eltern

Gutachter der Dissertation:	Prof. Dr. Susanne Dobler Prof. Dr. Baris Tursun
Tag der Disputation:	22. November 2024
Vorsitz:	Prof. Dr. Julia Kehr

Abstract

With half of the world's population living with the risk of a Malaria infection, malaria is one of the most devastating infectious diseases and remains a global burden to health and socio-economic structures in malaria endemic regions. The infection is transmitted through unicellular protozoa of the genus *Plasmodium* by certain *Anopheles* species to humans. Several human-infecting species are known, with *P. falciparum* being the most dangerous one causing the majority of malaria infections and deaths.

The onset of an infection with *Plasmodium* remains asymptomatic until the parasite enters the bloodstream, where it replicates within the red blood cells in *repeating* asexual cycles. As successful transmission from humans to mosquitoes is only possible through sexually determined gametocytes, a small subpopulation switches to sexual development at the end of each replication cycle. A key role to maintain this complex life cycle is the tight regulation of stage-specific gene expression. During asexual development, there are predominantly hierarchical and recurring expression patterns, with a supporting dynamic epigenetically regulated level. This allows the parasite to adapt to changes in the environment. The switch from asexual replication to sexual development is also under epigenetic control. Here, GDV1 is one of the most important factors, leading to the activation of the transcription factor AP2-G through its interaction with heterochromatic regions of the genome. AP2-G is the “master regulator” that specifically regulates genes associated with sexual commitment.

While epigenetic gene regulation is required for switching to sexual development, asexual development mainly relies on stage-specific expression. Thus, the process of invasion is characterized by a series of successive essential interactions that are based on fixed expression patterns. An example is the interaction of Rh5 with the receptor basigin. In turn Rh5 is part of the essential complex with CyRPA and Ripr, which is anchored to the surface of the merozoite via the binding of two other proteins. Additionally, non-essential proteins, some of which are heterochromatic and epigenetically regulated, are also involved in invasion. One such protein is DBLMSP2 expressed in a small subpopulation of schizonts and also associated with GDV1 and sexual development.

This thesis had three aims: (i) the functional investigation of the lectin activity of CyRPA, (ii) the physiological characterization of DBLMSP2 in the context of sexual development and (iii) the experimental verification of the potential PIN-like domain in GDV1.

Regarding the first goal, it was demonstrated that the lectin activity of CyRPA is necessary for efficient parasite invasion of erythrocytes. Followed by introducing conditionally inducible point mutations within the putative lectin-binding site, it was shown that the substitution of individual putative functional residues led to inhibition of parasite

growth.

Subsequent investigations showed that this effect was due to significantly reduced invasion rates, with the strongest effect caused by mutation of glutamine (E148). Based on *in vitro* experiments highlighting the affinity for binding to terminal sialic acids, further studies with CyRPA-E148A were performed, investigating the potential preference for binding of human α -2,6-Neu5Ac over primate α -2,6-Neu5Gc. Taken together, these results indicate that CyRPA likely plays an additional role by mediating further interaction with the erythrocyte surface during formation of the essential complex between Rh5, CyRPA and Ripr and invasion.

In the second part, the localization of mScarlet-tagged DBLMSP2 on the surface of merozoites was confirmed. Subsequently, it was shown that the loss of DBLMSP2 had no measurable effect on asexual and sexual development under cell culture conditions. Obviously, DBLMSP2 does not play a role in sexual development, however GDV1-dependent regulation has been demonstrated.

Additionally, compensatory effects were ruled out through the examination of DBLMSP1, another member of the MSP3-like family DBLMSP2 is belonging to. The loss of DBLMSP1 showed no effect on development, neither as a single knockout nor in combination with DBLMSP2.

In the third part, a putative PIN-like domain in GDV1 was identified through the use of algorithms for structure prediction, including HHpred and FoldSeek. The approximately 130 amino acid domains mostly exhibit nuclease activity and catalyze the cleavage of nucleic acids via four conserved residues. To verify functionality, parasites were generated that overexpressed modified GDV1 variants. The variants either had point mutations of potentially functional amino acids within the putative PIN domain or a deletion of the entire domain. In addition to a significant effect on sexual conversion, the overexpression of modified GDV1 variants showed varying tendencies for protein cytosolic localization.

In summary, this work provides profound insights into the function of CyRPA within the Rh5-CyRPA-Ripr complex and its interaction with the erythrocyte surface, as well as new approaches to elucidate the function of GDV1 and the specific regulation of epigenetically controlled genes. Additionally, the analysis of DBLMSP2 provides further important leads to processes regulated by GDV1.

Zusammenfassung

Weltweit lebt etwa die Hälfte der Bevölkerung in Malaria Risikogebieten, womit sie eine der schwerwiegendsten Infektionskrankheiten ist und eine globale Bedrohung für Gesundheit und sozio-ökonomische Strukturen in den Regionen mit endemischer Malaria darstellt. Die Infektion erfolgt durch die Übertragung einzelliger Protozoen der Gattung *Plasmodium* durch bestimmte Arten von *Anopheles* Moskitos auf den Menschen. Es gibt mehrere Arten, die den Menschen infizieren können, wobei *Plasmodium falciparum* die gefährlichste ist und den größten Anteil an weltweiten Malaria Infektionen und Todesfällen verursacht.

Am Beginn einer Infektion mit *Plasmodium* ist diese zunächst symptomlos, bis der Parasit die Blutbahn erreicht und sich dort in wiederkehrenden Zyklen ungeschlechtlich innerhalb der roten Blutzellen asexuell repliziert. Die Übertragung vom Menschen auf die Moskitos wird durch sexuell determinierte Gametozyten möglich, weshalb es notwendig ist, dass nach jedem Replikationszyklus ein Teil der Parasiten Population in die sexuelle Entwicklung übergeht. Eine zentrale Rolle zur Aufrechterhaltung dieses komplexen Lebenszyklus spielt eine strenge Regulation der Stadien-spezifischen Genexpression. Hierbei liegen während der asexuellen Entwicklung zumeist hierarchische, in jedem Zyklus wiederkehrende Expressionsmuster vor, die durch eine dynamisch veränderbare epigenetisch regulierte Ebene ergänzt sind. Dies ermöglicht den Parasiten eine Adaption an wechselnde Umweltbedingungen. Der Wechsel von der asexuellen Replikation zur sexuellen Entwicklung unterliegt ebenfalls einer epigenetischen Kontrolle. Hierbei ist GDV1 einer der wichtigsten Faktoren, der durch Interaktion mit heterochromatischen Bereichen des Genoms zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP2-G führt. AP2-G ist ein „Master Regulator“, welcher spezifisch Gene reguliert, deren Transkription für die sexuelle Entwicklung nötig sind.

Während eine epigenetisch regulierte Expression Voraussetzung für den Wechsel in die sexuelle Entwicklung ist, unterliegen die Prozesse der asexuellen Entwicklung hauptsächlich einer Stadien-spezifischen Expression. So ist der Ablauf der Invasion gekennzeichnet durch eine Reihe aufeinanderfolgender essentieller Interaktionen, denen festgelegte Expressionsmuster zugrunde liegen. Ein Beispiel hierfür ist die Interaktion von Rh5 mit dem Rezeptor Basigin. Rh5 wiederum ist Teil des essentiellen Komplexes mit CyRPA und Ripr, der über die Bindung zwei weiterer Proteine an der Oberfläche des Merozoiten verankert ist. An der Invasion sind zusätzlich nicht-essentielle Proteine beteiligt, die teilweise heterochromatisch vorliegen und epigenetisch reguliert werden. Eines dieser Proteine ist DBLMSP2, welches in einer kleinen Subpopulation von Schizonten exprimiert wird und unter anderem auch mit GDV1 und sexueller Entwicklung in Zusammenhang steht.

Die Arbeit hatte drei Ziele: (I) Die funktionelle Untersuchung der Lektin-Aktivität von CyRPA, (II) die physiologische Aufklärung von DBLMSP2 im Zusammenhang mit sexueller Entwicklung und (III) die experimentelle Überprüfung der potentiellen PIN-ähnlichen Domäne in GDV1.

Im Hinblick auf das erste Ziel konnte zunächst gezeigt werden, dass die Lektin-Aktivität von CyRPA notwendig für eine effiziente Invasion der Parasiten in den Erythrozyten ist. Mit Hilfe konditional induzierbarer Punktmutationen innerhalb der potentiellen Lektin-Bindestelle konnte gezeigt werden, dass der Austausch der einzelnen putativen funktionalen Reste zu einer Inhibierung des Parasiten Wachstums führte. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass dieser Effekt auf stark verminderte Invasionsraten zurückzuführen ist, wobei der stärkste Effekt durch Mutation der Glutaminsäure (E148) verursacht wurde. Ausgehend von den *in vitro* Experimenten, die eine Affinität für die Bindung von endständig gebundenen Neuraminsäuren zeigten, wurden weiterführende Untersuchungen mit CyRPA-E148A hinsichtlich einer Präferenz zur Bindung von humanen α -2,6-Neu5Ac gegenüber dem bei Primaten vertretenen α -2,6-Neu5Gc durchgeführt. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass CyRPA während der Invasion nicht nur eine Rolle in der Bildung des essentiellen Komplexes zwischen Rh5, CyRPA und Ripr zukommt, sondern höchstwahrscheinlich auch weitere Interaktion mit der Oberfläche des Erythrozyten durch CyRPA vermittelt werden.

Im zweiten Teil wurde zunächst die Lokalisation von mScarlet-markiertem DBLMSP2 an der Oberfläche von Merozoiten bestätigt. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass der Verlust von DBLMSP2 keinen messbaren Effekt auf die asexuelle und sexuelle Entwicklung unter Zellkulturbedingungen zeigt. Obwohl DBLMSP2 offensichtlich keine Rolle während der sexuellen Entwicklung spielt, ließ sich eine GDV1-abhängige Regulation nachweisen.

Zusätzlich wurden durch die Untersuchung von DBLMSP1, eines weiteren Mitglieds der MSP3-ähnlichen Proteine zu denen DBLMSP2 gezählt wird, kompensatorische Effekte ausgeschlossen. Der Verlust von DBLMSP1 zeigte keinen Effekt auf die Entwicklung, weder als „Single-KO“ noch in Kombination mit DBLMSP2.

Im dritten Teil konnte durch den Einsatz von Algorithmen zur Strukturvorhersage, unter anderem HHpred und FoldSeek, eine PIN-ähnliche Domäne in GDV1 identifiziert werden. Die etwa 130 Aminosäuren umfassenden Domänen, weisen zumeist eine Nuklease-Aktivität auf und katalysieren über vier konservierte Reste die Spaltung von Nukleinsäuren. Zur Überprüfung der Funktionalität wurde Parasiten hergestellt die modifizierte GDV1 Varianten überexprimieren. Die Varianten verfügten entweder über Punktmutationen der potentiell funktionellen Aminosäuren innerhalb der identifizierten PIN-Domäne oder einer Deletion der gesamten Domäne. Die Überexpression der

modifizierten GDV1 Varianten zeigte neben einem starken Effekt auf die sexuelle Konversion, eine unterschiedlich starke Tendenz zur Lokalisation des Proteins im Cytosol des Parasiten.

Zusammengefasst bietet diese Arbeit sowohl tiefergehende Erkenntnisse der Funktion von CyRPA innerhalb des Rh5-CyRPA-Ripr-Komplexes und der Interaktion mit der Erythrozytenoberfläche. Als auch neue Ansätze zur Aufklärung der Funktion von GDV1 und der spezifischen Regulierung epigenetisch gesteuerter Gene. Zudem liefert die durchgeführte Analyse von DBLMSP2 weitere wichtige Hinweise auf weitere durch GDV1 regulierte Prozesse.

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIX
1 EINLEITUNG	1
1.1 MALARIA	1
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE	2
1.1.2 BEHANDLUNG UND PRÄVENTION	3
1.2 BIOLOGIE VON <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	6
1.2.1 LEBENSZYKLUS	6
1.2.2 GRUNDLAGEN DER REGULATION DER TRANSKRIPTION IN <i>P. FALCIPARUM</i>	11
1.2.3 INVASION	16
1.2.3.1 CYSTEINE-RICH PROTECTIVE ANTIGENE (CYRPA)	18
1.2.4 SEXUELLE DIFFERENZIERUNG: DER WECHSEL VON ASEXUELLER PROLIFERATION ZU SEXUELL DETERMINIERTER ENTWICKLUNG	22
1.2.4.1 DUFFY-BINDING LIKE MEROZOITE SURFACE PROTEIN (DBLMSP2)	24
1.2.4.2 GAMETOCYTE DEVELOPMENT PROTEIN 1 (GDV1)	29
1.3 ZIEL DER ARBEIT	30
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 MATERIAL	31
2.1.1 VERWENDETE ORGANISMEN	31
2.1.1.1 ZELL-LINIEN	31
2.1.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	33
2.1.3 KITS	36
2.1.4 PUFFER UND LÖSUNGEN	36
2.1.4.1 LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR MIKROBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE METHODEN	36
2.1.4.2 PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	40
2.1.5 ANTIBIOTIKA UND ANDERE ZUSÄTZE	42

2.1.6	ANTIKÖRPER UND FLUORESCENZFARBSTOFFE	42
2.1.7	ENZYME	44
2.1.8	OLIGONUKLEOTIDE	44
2.1.9	VEKTOREN UND PLASMIDE	49
2.1.10	KULTURMEDIENTEN	51
2.1.11	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	52
2.1.12	DATENBANKEN, SOFTWARE UND ONLINETOOLS	55
2.2	METHODEN	56
2.2.1	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	56
2.2.1.1	STERILISATION VON LÖSUNGEN UND MATERIALIEN	56
2.2.1.2	KULTIVIERUNG UND LAGERUNG VON BAKTERIEN	56
2.2.1.3	HERSTELLUNG VON CHEMISCH KOMPETENTEN <i>E. COLI</i>	57
2.2.1.4	HITZESCHOCKTRANSFORMATION VON KOMPETENTEN <i>E. COLI</i> -ZELLEN	57
2.2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	57
2.2.2.1	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) ZUR AMPLIFIKATION VON DNA	57
2.2.2.2	AGAROSE GELELEKTROPHORESE	59
2.2.2.3	AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN	59
2.2.2.4	RESTRIKTIONSVERDAU VON NUKLEINSÄUREN UND VEKTOREN	59
2.2.2.5	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN UND PLASMIDEN	60
2.2.2.6	DNA-LIGATION ÜBER GIBSON-ASSEMBLY	60
2.2.2.7	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS <i>E. COLI</i> (MINI-PREP UND MIDI-PREP)	61
2.2.2.8	EXTRAKTION VON GENOMISCHER DNA AUS <i>P. FALCIPARUM</i>	61
2.2.2.9	BESTIMMUNG VON DNA-KONZENTRATIONEN	61
2.2.2.10	SEQUENZIERUNG VON PLASMID-DNA	61
2.2.2.11	DNA-FÄLLUNG MIT NATRIUMACETAT	61
2.2.2.12	KLONIERUNG VON CRISPR/CAS PLASMIDEN ZUR GENOM-EDITIERUNG	62
2.2.3	BIOCHEMISCHE METHODEN	66
2.2.3.1	DENATURIERENDE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	66
2.2.3.2	IMMUNOLOGISCHE DETEKTION VON PROTEINEN IM WESTERN BLOT	67
2.2.4	ZELLKULTURTECHNIKEN FÜR <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	67
2.2.4.1	KONTINUIERLICHE KULTIVIERUNG VON <i>P. FALCIPARUM</i>	67
2.2.4.2	GIEMSA-FÄRBUNG VON BLUTAUSSTRICHEN	68
2.2.4.3	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON PARASITEN-KRYOSTABILATEN	68
2.2.4.4	BEGRENZTE SAPONIN-LYSE ZUR EXTRAKTION VON <i>P. FALCIPARUM</i> AUS ERYTHROZYTEN	68
2.2.4.5	SYNCHRONISIERUNG VON PARASITEN IM RINGSTADIUM	69
2.2.4.6	ISOLIERUNG VON SCHIZONTEN ÜBER EINEN PERCOLL-GRADIENTEN	69
2.2.4.7	ENGE SYNCHRONISATION DURCH REINVASION	69
2.2.4.8	TRANSFEKTION VON <i>P. FALCIPARUM</i>	70

2.2.4.9	SEPARIERUNG EINZELNER KLONE DURCH LIMITIERENDE VERDÜNNUNG (PLAQUE ASSAY)	71
2.2.4.10	INDUKTION DER EXZISION <i>LOXP</i> -INTRON FLANKIERTER SEQUENZEN	72
2.2.4.11	WACHSTUMSANALYSEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	72
2.2.4.12	EGRESS- UND INVASIONS-ASSAYS	72
2.2.4.13	COMMITMENT-ASSAYS	73
2.2.5	MIKROSKOPIE	73
2.2.5.1	LICHTMIKROSKOPIE	73
2.2.5.2	VORBEREITUNG DES PARASITENMATERIALS	73
2.2.5.3	IMMUNFLUORESCENZ-ASSAY (IFA) TRANSGENER PARASITEN	74
2.2.5.4	FLUORESCENZMIKROSKOPIE	75
2.2.6	BIOINFORMATISCHE METHODEN	75
2.2.6.1	MODELLIERUNG VON PROTEINSTRUKTUREN	75
2.2.6.2	IDENTIFIZIERUNG FUNKTIONALER DOMÄNEN UND KONSERVIERTER SEQUENZBEREICHE	76
3	ERGEBNISSE	77
3.1	UNTERSUCHUNG DES EFFEKTS VON SPEZIFISCHEN PUNKTMUTATIONEN AUF DIE FUNKTION VON CYRPA	77
3.1.1	LEKTIN-BINDESTELLEN UND ASP-BOX	77
3.1.2	GENERIEREN TRANSGENER PARASITEN MIT HILFE DES KONDITIONALEN DICRE REKOMBINASE SYSTEMS	78
3.1.3	EXPRESSION DER VERSCHIEDENEN CYRPAMUT VARIANTEN NACH INDUZIERTER EXZISION	81
3.1.4	EIN AUSTAUSCH DER AMINOSÄUREN BEEINTRÄCHTIGT NICHT DIE BINDUNG ZWISCHEN CYRPA UND DEM MONOKLONALEN ANTIKÖRPER α -CYRPA C10	86
3.1.5	DIE EXPRESSION DER VERSCHIEDENEN CYRPA VARIANTEN HAT UNTERSCHIEDLICHEN EINFLUSS AUF DIE PROLIFERATION DER PARASITEN UND DIE EFFIZIENZ DER INVASION	89
3.1.6	DER AUSTAUSCH DER AMINOSÄURE E148 ZEIGT KEINEN EINDEUTIGEN EINFLUSS AUF DIE BINDUNG VON GLYKANEN AN DER OBERFLÄCHE VON ERYTHROZYTEN <i>IN VIVO</i>	95
3.2	DIE ROLLE DER BEIDEN DBLMSP PROTEINE WÄHREND DER ENTWICKLUNG DES PARASITEN	98
3.2.1	DBLMSP2 IST AN DER OBERFLÄCHE VON MEROZOITEN LOKALISIERT	98
3.2.2	BEI DBLMSP2 HANDELT ES SICH UM EIN FÜR ASEXUELLE PROLIFERATION NICHT-ESSENTIELLES PROTEIN	101
3.2.3	DER VERLUST VON DBLMSP2 HAT KEINEN RELEVANTEN EINFLUSS AUF DIE GAMETOZYTEN ENTWICKLUNG UND DIE SEXUELLE KONVERSION	103

3.2.4	DIE ANZAHL DBLMSP2 EXPRIMIERENDER SCHIZONTEN IST TROTZ SIGNIFIKANT NEGATIVER KORRELATION MIT GDV1 EXPRIMIERENDEN PARASITEN NACH INDUZIERTER SEXUELLER KONVERSION SIGNIFIKANT ERHÖHT	106
3.2.5	DIE EXPRESSION VON DBLMSP2 UNTERLIEGT EINER GDV1-ABHÄNGIGEN REGULATION	108
3.2.6	DIE BEIDEN DBL-DOMÄNEN TRAGENDEN PROTEINE DER MSP3-ÄHNLICHEN PROTEINFAMILIE SIND NICHT REDUNDANT	111
3.2.7	DBLMSP1 HAT KEINEN EFFEKT AUF DAS ÜBERLEBEN DER PARASITEN UND DAS SEXUELLE COMMITMENT	112
3.2.8	DAS FEHLEN BEIDER PROTEINE HAT KEINEN DIREKTEN EFFEKT AUF DIE ENTWICKLUNG VON <i>P. FALCIPARUM</i>	114
3.2.9	DIE EXPRESSION VON DBLMSP2 WIRD NICHT DURCH DEN KNOCKOUT VON DBLMSP1 VERSTÄRKT	115
3.3	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER PUTATIVEN FUNKTIONELLEN DOMÄNE VON GDV1	117
3.3.1	MODELLIERUNG DER STRUKTUR VON GDV1 ÜBER ALPHAFOLD 2 UND I-TASSER	117
3.3.2	DER HOCHKONSERVIERTE BEREICH DER <i>GDV1</i> SEQUENZ INNERHALB DER PRIMATEN INFIZIERENDEN <i>PLASMODIUM</i> SPEZIES ÄHNELT EINER PIN-DOMÄNE	118
3.3.3	GENETISCHE MODIFIKATION DES <i>GDV1</i> LOCUS FÜR EINEN GENKNOCKOUT UND GDV1 VARIANTEN	124
3.3.4	DIE EINZELNEN GDV1 VARIANTEN HABEN UNTERSCHIEDLICHEN EINFLUSS AUF DIE SEXUELLEN KONVERSIONSRATEN DES PARASITEN	127
3.3.5	DIE LOKALISATION DER GDV1 VARIANTEN IST NICHT AUF DEN NUCLEUS BESCHRÄNK	128
4	DISKUSSION	133
4.1	DIE ROLLE DER PUTATIVEN LEKTIN-BINDESTELLE UND ASP-BOX VON CYRPA WÄHREND DER INVASION VON HUMANEN ERYTHROZYTEN	134
4.1.1	DIE PUTATIVE LEKTIN-BINDESTELLE UND DIE ASP-BOX VON CYRPA SIND TROTZ FEHLENDER SIALIDASE-AKTIVITÄT NOTWENDIG FÜR EINE EFFIZIENTE INVASION	136
4.1.2	DIE MUTATION AN POSITION E148 HAT KEINEN EFFEKT AUF EINE SPEZIFISCHE BINDUNG VON NEURAMINSÄUREN <i>IN VIVO</i>	139
4.2	DIE EXPRESSION VON DBLMSP2 UNTERLIEGT EINER GDV1-ABHÄNGIGEN REGULATION	142
4.2.1	DBLMSP2 HAT TROTZ GDV1-ABHÄNGIGER EXPRESSION KEINEN EFFEKT AUF DIE SEXUELLE ENTWICKLUNG	143
4.2.2	DIE FUNKTIONALITÄT DER BEIDEN DBL-DOMÄNE TRAGENDEN MSP3-ÄHNLICHEN PROTEINE IST NICHT-ESSENTIELL FÜR DIE INVASION VON ERYTHROZYTEN <i>IN VITRO</i>	147

4.3 EINE PUTATIVE FUNKTIONELLE DOMÄNE VON GDV1 HAT EINE PIN-DOMÄNEN-ÄHNLICHE STRUKTUR	149
4.3.1 DIE STRUKTUR VON GDV1 LIEFERT HINWEISE AUF SEINE REGULATORISCHE FUNKTIONSWEISE UND EINE PUTATIVE FUNKTIONELLE DOMÄNE	150
4.3.2 DIE PUTATIVE PIN-DOMÄNE IST NOTWENDIG FÜR DIE NUKLEÄRE LOKALISATION UND FUNKTION VON GDV1	153
4.4 ZUSAMMENFASSUNG	155
LITERATURVERZEICHNIS	158
ANHANG	180
DANKSAGUNG	187
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	189

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
ad	fülle auf
ACT	Artemisinin basierte Kombinationstherapie
ACP	Acyl Carrier Protein
AK	Antikörper
AMA1	Apical Membrane Antigen 1
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
asRNA	<i>antisense RNA</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bromo-Domäne
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSD	Blasticidin S
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
Chp1	Chromodomain Protein 1
ChIP-seq	<i>Comparative Chromatin Immunoprecipitation-sequencing</i>
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CMAH	Cytidin Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure Hydroxylase
CSP	Circumsporozoiten Protein
CSS	Cystein-rich small secreted protein
c _x	Konzentration von x
CyRPA	Cysteine-rich Protective Antigene
C2	Compound 2
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DBL	Duffy-binding like

DBLMSP	Duffy-binding like merozoite surface protein
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIC	Diffentieller Interferenz Kontrast
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM1	5-Methyl-N-(2-naphtyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amin
DTT	Dithiothreitol
EACA	6-Aminocapronsäure
EBA	Erythrocyte-binding Antigen
EBL	Erythrocyte binding-like
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglycol-bis(aminoethylether)tetra-essigsäure
EMP1	Erythrocyte Membrane Protein 1
ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKBP	FK506-binding Protein
FRB	FKBP-Rapamycin-bindende Domain
FV	Nahrungsvakuole
fwd	forward
g	Gramm
G	Guanin, Glycin
gDNA	genomische DNA
GDV1	Gametocyte development protein 1
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
Gm	Gentamycin
Gm ^r	Gentamycin Resistenz
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
Griech.	Griechisch
gRNA	Guide-RNA
h	Stunden
H3K9me3	Trimethyliertes Lysin 9 am Histon 3

HA	Hemagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Salzsäure
Hda2	<i>Histon Deacetylase 2</i>
hDFHR	humane Dihydrofolatreduktase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
hpi	Stunden nach der Infektion (<i>hours past infection</i>)
I-TASSER	<i>Iterative Threading ASSEMBly Refinement</i>
IFA	Immunfluoreszenz Assay
IMC	Innerer Membran Komplex
k	kilo
K	Lysin
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Knockin
KO	Knockout
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
LB	Lysogeny Broth
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
Lyso-PC	Lysophosphatidylcholin
m	mili, monoklonal
mm	Milimeter
M	Mol
MCS	Multiple Cloning Side
MeOH	Methanol
MFS	<i>Malaria Freezing Lösung</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
MSP	Merozoite Surface Protein
MTS	<i>Malaria Thawing Solution</i>
n	nano
NaAc	Natriumacetat (NaCH ₃ COO)
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat

NaOH	Natronlauge
NCC	<i>Next Cycle Conversion</i>
ncRNA	nicht-codierende RNA
Neo	Neomycin
NLS	Nuclear Lokalisation Signal
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
P	Phosphat
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEV	Prä-Erythrozytische Vakzine
PIN	PilT N-terminus
PPM	Parasitäre Plasmamembran
PTM	Posttranslationales Muster
PTRAMP	Plasmodium Thrombospondin-related apical merozoite protein
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
RBL	<i>Reticulocyte Binding-like</i>
rev	reverse
Rh	Reticulocyte-binding-like Protein Homolog
Ripr	Rh5-interacting Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RON2	<i>Rhoptry Neck Protein 2</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SCC	<i>Same Cycle Conversion</i>
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
Sek	Sekunden
SEMA	Semaphorin
SERA	Sera Repeat Antigen
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
<i>spp</i>	Species Pluralis
T	Thymin; Temperatur
T _a	Annealingtemperatur

T _m	Schmelztemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAG	Triacylglycerol
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TB	Transfektionspuffer
TBV	<i>Transmission blocking vaccines</i>
TEMED	Tetramethylethylendiademin
TGF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethyl
U	Units, Umdrehung
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
UTR	nicht translatierte Region
V	Volt
v/v	Volumenprozent
var	Variant Surface Antigene
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WR99210	1,6-Dihydro-6,6-dimethyl-1-[3-(2,4,5-trichlorphenoxy)propyl]- 1,3,5-triazine-2,4-diamine
WT	Wildtyp
w/v	Massenprozent
xg	vielfaches der Erdbeschleunigung
yDHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase aus Hefe
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Glu	Glutamin			

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Verbreitungsgebiete der Malaria weltweit.....	2
Abbildung 2 Übersicht über die aktuellen Vakzin Kandidaten	4
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	6
Abbildung 4 Asexuelle Leberstadien von <i>P. falciparum</i>	7
Abbildung 5 Asexuelle Entwicklung von <i>P. falciparum</i> im Erythrozyten.	8
Abbildung 6 Sexuelle Entwicklung von <i>P. falciparum</i>	10
Abbildung 7 Schematische Darstellung des Invasionsprozesses.	16
Abbildung 8 CyRPA Kristallstruktur	19
Abbildung 9 Analyse der Bindungsstärke von CyRPA an Trisaccharide.....	20
Abbildung 10 Molekulare Strukturmodell von CyRPA im Komplex mit mAK C12 und α -2,6-SLN-Ac.	21
Abbildung 11 Schema zur Regulation der sexuellen Determination (Commitment) von <i>P. falciparum</i>	23
Abbildung 12 Strukturmodell der DBL-Domäne von DBLMSP2.	27
Abbildung 13 Vergleich der Expressionslevel aller Gene von asexuellen und sexuellen Parasiten.	28
Abbildung 14 Position der ausgetauschten Aminosäuren innerhalb der dreidimensionalen Proteinstruktur von CyRPA.	77
Abbildung 15 Modifikation des CyRPA Locus mittels CRISPR/Cas-basierter Integration.	81
Abbildung 16 Expression der CyRPAmut Varianten durch induzierte Exzision im Ziellokus.....	83
Abbildung 17 Expression der CyRPAmut Varianten durch induzierte Exzision im Ziellokus.....	85
Abbildung 18 Lokalisation der modifizierten CyRPA Varianten und Bindung des α -CyRPA C10 Antikörpers.....	87
Abbildung 19 Lokalisation der modifizierten CyRPA Varianten und Bindung des α -CyRPA C10 Antikörpers.....	88
Abbildung 20 Lokalisation der modifizierten CyRPA Varianten und Bindung des α -CyRPA C10 Antikörpers.....	89
Abbildung 21 Die Expression der einzelnen CyRPAmut Varianten zeigt unterschiedlichen starken Effekt auf die Proliferation der transgenen Parasiten.	90
Abbildung 22 Charakterisierung des Einflusses der Punktmutation innerhalb der putativen Lektin-Bindestelle auf das Wachstum der Parasiten.....	92

Abbildung 23 Charakterisierung des Einflusses der Punktmutation innerhalb der putativen Lektin-indestelle auf das Wachstum der Parasiten.....	93
Abbildung 24 Charakterisierung des Einflusses der Punktmutation innerhalb der putativen ASP-Box auf das Wachstum der Parasiten..	94
Abbildung 25 Bindung von Neu5Ac an CyRPA-E148A exprimierende Parasiten.	96
Abbildung 26 Bindung von Neu5Gc an CyRPA-E148A exprimierende Parasiten.	97
Abbildung 27 Generieren von transgenen DBLMSP2-mScarlet exprimierenden Parasiten Linien.	99
Abbildung 28 Lokalisation von DBLMSP2 an der Oberfläche von Merozoiten.....	100
Abbildung 29 Generieren von transgenen 3D7 Parasiten mit einem funktionalen DBLMSP2-KO.....	102
Abbildung 30 Einfluss des DBLMSP2-KO auf die sexuelle Differenzierung zu Gametozyten.....	104
Abbildung 31 Korrelation zwischen DBLMSP2 und GDV1 Expression in sexuell determinierten Parasiten.....	107
Abbildung 32 Generieren eines funktionalen GDV1-KOs in 3D7/DBLMSP2-mScarlet Parasiten..	109
Abbildung 33 GDV1-abhängige Expression von DBLMSP2.	111
Abbildung 34 Generieren von transgenen Parasiten mit einem funktionalen DBLMSP1-KO.....	113
Abbildung 35 Einfluss des „Single“ DBLMSP1-KO auf die asexuelle Proliferation und die sexuelle Konversion.	114
Abbildung 36 Einfluss des doppelten Knockouts von DBLMSP1 und DBLMSP2 auf die asexuelle Proliferation und die sexuelle Konversion.	115
Abbildung 37 Expression von DBLMSP2 in Abwesenheit von DBLMSP1.	116
Abbildung 38 Mögliche dreidimensionale Struktur von GDV1.....	117
Abbildung 39 Sequenz-Alignment der 3D7 GDV1 Sequenz mit der Konsensus-Sequenz der Primaten-infizierenden Plasmodium Arten.	119
Abbildung 40 Visualisierte Darstellung der HHPred Suche nach putativen funktionalen Domänen von GDV1.	120
Abbildung 41 FoldSeek-Alignments der putativen funktionalen Domäne mit strukturell ähnlichen Domänen.....	122
Abbildung 42 Position der putativen funktionalen Domäne von GDV1. dargestellt.....	124
Abbildung 43 Generieren von transgenen 3D7 Parasiten mit einem funktionalen GDV1-KO.....	126
Abbildung 44 Sexuelle Konversionsraten der 3D7-KO Linien und episomal exprimierten GDV1 Varianten.....	127

Abbildung 45 Lokalisation der GDV1 Varianten während der einzelnen Blutstadien. .	130
Abbildung 46 Verteilung des GFP-Signals in den GDV1mut Linien.....	131
Abbildung 47 Kern-assoziierte und rein cytosolische Lokalisation von GDV1 Δ 384-421..	132

1 Einleitung

1.1 Malaria

Bei der Malaria handelt es sich um eine von weiblichen *Anopheles* Mücken übertragene Infektionskrankheit, die bereits seit Tausenden von Jahren beim Menschen zu Erkrankungen und Todesfällen führt. Die ersten Erwähnungen von Krankheiten mit malariaartigen Symptomen finden sich schon in Jahrhunderte alten Dokumenten (62). Der eigentliche Erreger wurde 1880 von Charles L.A. Laveran in infizierten Blutzellen entdeckt und erst später wurde eine Übertragung durch Mücken vermutet (167).

Hierbei handelt es sich um einen einzelligen Organismus, der zur Gruppe der Apicomplexa gehörenden Protozoen der Gattung *Plasmodium* gezählt wird. Die Gattung *Plasmodium* gehört systematisch zur Familie der *Plasmodiidae*, die ihrerseits zur Ordnung der *Haemosporidae* gezählt werden, welche dem Stamm der Apicomplexa untergeordnet ist (264). Weitere bekannte Vertreter des Stamms neben *Plasmodium spp.*, sind *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium spp.*, *Theileria spp.* und *Eimeria spp.* *Plasmodium spp.* sind obligat intrazellulär lebende Parasiten mit einem komplexen Lebenszyklus, der zwischen einem Wirbeltier und einem Moskito als Wirt wechselt. Eine Infektion mit *Plasmodium* äußert sich zunächst durch ein Auftreten unspezifischer Grippe-ähnlicher Symptome, wie Schüttelfrost, Fieber, Schwindel, Kopf- und Gliederschmerzen. Der spezifische Verlauf wird durch die verursachende *Plasmodium* Spezies bestimmt, wobei dieser bei der Malaria tropicana, verursacht durch *P. falciparum*, sehr schnell schwere Verläufe annehmen kann. Zusätzlich zu den Fieberschüben treten beim schweren Verlauf eine vergrößerte Milz, starke Anämien, Azidosen, Lungenödeme, Hypoglykämie und Niereninsuffizienz auf. Ein Vordringen der Erreger in das zentrale Nervensystem löst eine zerebrale Malaria mit Lähmungen und Krampfanfällen bis zum Koma aus. Häufig führt dies dann zum Tod der Betroffenen (115).

Von den 200 bekannten Arten, die sowohl Säugetiere, als auch Vögel und Reptilien infizieren können, sind *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi* als humanpathogen bekannt (295). Obwohl *P. falciparum* der virulenteste von ihnen ist, gewinnen *P. knowlesi* und *P. vivax* zunehmend an Aufmerksamkeit, da durch diese Arten verursachte Infektionen in den letzten Jahren erheblich gestiegen sind (4). Von dem übertragenden Vektor, der *Anopheles* Mücke, sind etwa 420 Arten bekannt, von denen etwa 40 in der Lage sind den Parasiten auf den Menschen zu übertragen. Als Hauptüberträger gilt die hauptsächlich in den Tropen und Subtropen beheimatete *Anopheles gambiae* (257).

1.1.1 Epidemiologie

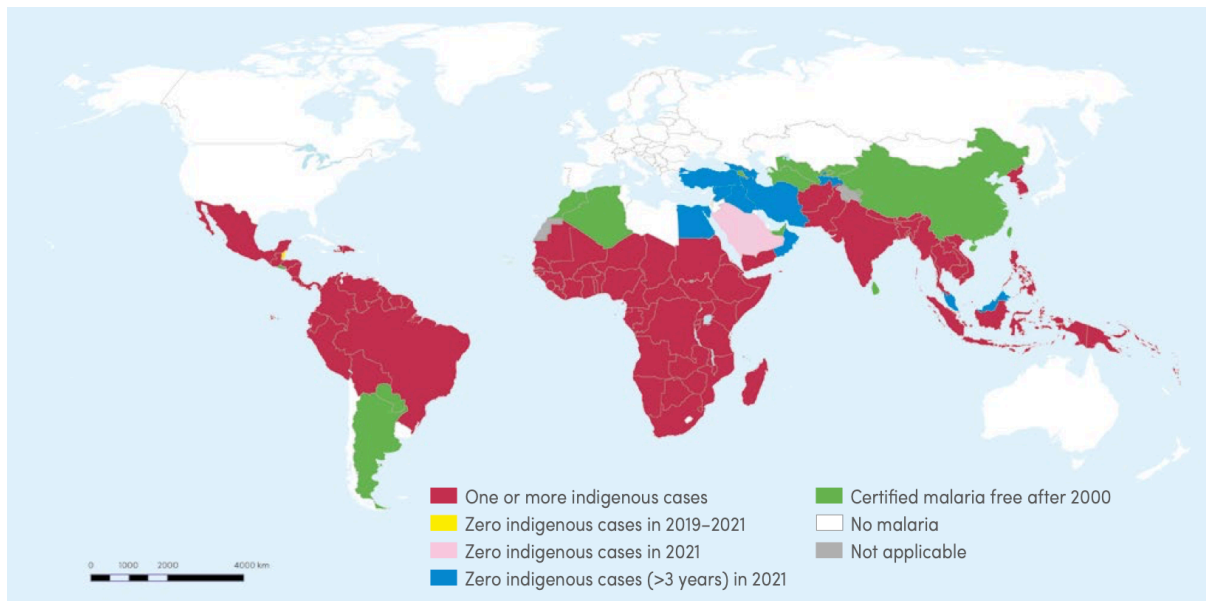


Abbildung 1 Verbreitungsgebiete der Malaria weltweit. Farbig dargestellt sind alle Länder die bis ins Jahr 2000 als Endemiegebiete der Malaria galten und deren aktueller Status (2021). Als Malaria-frei werden Länder bezeichnet die innerhalb von drei aufeinanderfolgenden Jahren keine erneuten Malariafälle zu verzeichnen hatten. In 2021 wurden aus dem Iran und aus Malaysia das vierte Jahr in Folge keine neuen Fälle gemeldet. Aus Belize und den Cap Verden wurden zum dritten Mal keine neuen Fälle gemeldet. China und El Salvador sind seit 2021 als Malaria-frei zu betrachten, nachdem vier Jahre lang keine neuen Fälle gemeldet wurden. Die weltweite Verteilung kann dem Farbcode in der Abbildung entnommen werden (214).

Weltweit betrachtet bedeutet dies, dass etwa die Hälfte der Bevölkerung mit dem Risiko einer Malariainfektion lebt und der Großteil der Todesfälle (76%) in Folge einer Malaria Infektion auf Kinder im Alter von unter 5 Jahren fallen (214). Neben AIDS/HIV und Tuberkulose ist Malaria die Infektionskrankheit mit den meisten Todesfällen weltweit, mit dem größten Anteil der Infektionen in den afrikanischen Regionen südlich der Sahara. Seit 2000 ist die Malaria Inzidenz bis zum Beginn der COVID-19 Pandemie in 2020 kontinuierlich gesunken (214). In 2021 wurden etwa 247 Millionen Fälle in den 84 Malaria endemischen Ländern registriert, wobei eine Verteilung von 95% der Fälle auf Gebiete in Afrika (234 Millionen Fälle), gefolgt von der östlichen Mittelmeer Region mit etwa 2,5% (6,2 Millionen Fälle) und Südostasien mit 2% (5 Millionen Fälle) zu verzeichnen gewesen ist (214). Der Anstieg der Fallzahlen während der COVID-19 Pandemie ist hauptsächlich auf das Wegfallen geplanter Präventionsmaßnahmen, Diagnostik und Behandlung zurückzuführen, was wiederum die Dringlichkeit in der Kontinuität dieser Maßnahmen zeigt (214). Von den fünf humanpathogenen *Plasmodium* Spezies weist *P. falciparum* mit Abstand die größte Prävalenz auf und ist für 98% der auftretenden Infektionen verantwortlich. Während in Afrika nur 0,3% der Infektionen auf *P. vivax* fallen, so sind es in Asien schon 39,7% und in der östlichen Mittelmeer Region

18% (214). Außerdem wurde in Südostasien ein nicht unerheblicher Anstieg von Infektionen mit *P. knowlesi* seit 2017 verzeichnet (214).

Die Hälfte aller Todesfälle (619.000 im Jahr 2021) konzentrierte sich auf die Länder Nigeria (31%), die Demokratische Republik Kongo (13%), Niger (4%) und die Vereinigte Republik Tansania (4%).

1.1.2 Behandlung und Prävention

Zur Bekämpfung der Malaria stehen unterschiedliche Strategien zur Verfügung, die sowohl Maßnahmen zur Vektorkontrolle, Diagnostik als auch die Entwicklung und Nutzung verschiedener Medikamente und Impfstoffe umfassen.

Als erstes Anti-Malaria-Medikament wurde im Jahr 1820 Quinin angewandt, welches aus dem Chinarindenbaum extrahiert wurde und eine aktive Wirkung gegen die asexuellen Blutstadien hat. Sein Derivat das Chloroquin hemmt beim Abbau des Hämoglobins die Kristallisation zu Hämozoin, welches dann zur Bildung des auf den Parasiten toxisch wirkenden Hämatin führt (104). Erste Resistenzen gegenüber Chloroquin wurden überraschend schnell in den 1950ern gefunden (216). Alternativ werden häufig Derivate des Chinins, wie Mefloquin, Primaquin und Lumefantrin eingesetzt (243).

Die Antifolate haben den Folsäure-Metabolismus des Parasiten als Angriffsziel. *Plasmodium* ist auf eine *de novo* Synthese von Folsäuren angewiesen, Folsäuren dienen beim Aminosäure- und Nukleinsäurestoffwechsel als Cofaktoren und sind daher von großer Bedeutung. Durch Mutationen im Gen der Dihydrofolat Reduktase (DHFR) sind Resistenzen inzwischen schon weit verbreitet (75).

Atovaquon ist neben dem Antifolat Proguanil Bestandteil des Kombinationspräparats Malarone®, welches sowohl zur Akutbehandlung als auch als Prophylaxe eingesetzt werden kann. Atovaquon wirkt als Inhibitor in der Elektronentransportkette des Mitochondriums. Auch hier können sich Resistenzen ausbilden, allerdings wurde in weiteren Untersuchungen festgestellt, dass diese Mutationen ein Überleben des Parasiten in der Mücke unmöglich macht und somit auch eine weitere Verbreitung (125). In der derzeitigen Malaria-Therapie findet ein weiterer Naturstoff, das heute halbsynthetisch hergestellte Artemisinin und seine entsprechenden Derivate, Anwendung (288). Da mittlerweile auch gegen Artemisinin Resistenzen weit verbreitet sind, wird von der WHO häufig eine Artemisinin-basierte Kombinationstherapie mit Wirkstoffen wie Lumefantrin, Mefloquin, Amodiaquin oder Piperaquin empfohlen, um die zunehmende Resistenzbildung zu verhindern (214).

Die zunehmende Ausbildung und globale Verbreitung von Resistenzen bei *Plasmodium* machen die konsequente Nutzung präventiver Maßnahmen zu einer wichtigen Maßnahme bei der Bekämpfung der Malaria. Hier ist eine der Hauptstrategien die

Vektorkontrolle, welche hauptsächlich drauf abzielt die Wahrscheinlichkeit von einer Mücke gestochen zu werden zu reduzieren.

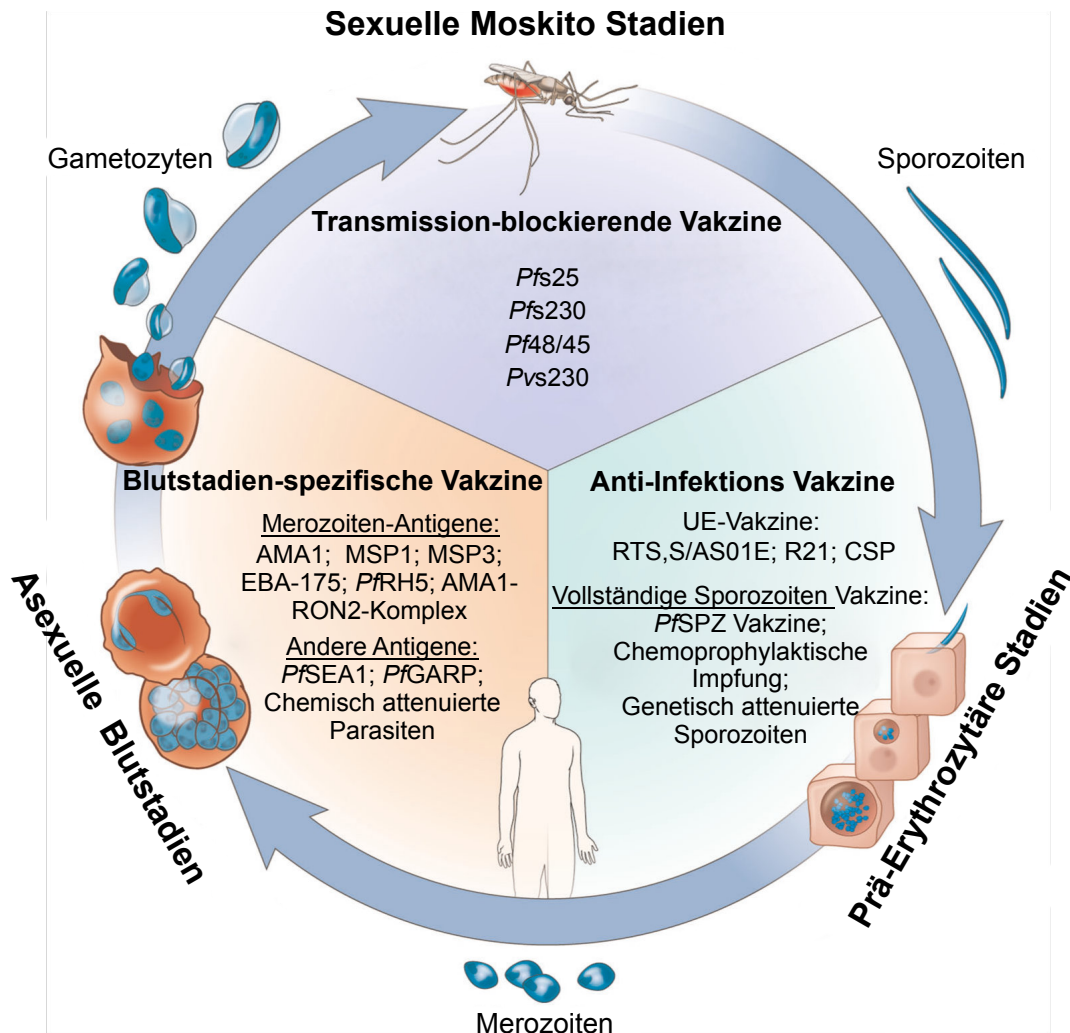


Abbildung 2 Übersicht über die aktuellen Vakzin Kandidaten eingeteilt nach ihrem Wirkort während der Entwicklung von *P. falciparum*. Aufgeführt sind Kandidaten, die seit 2000 entweder in der vorklinischen Entwicklung befunden haben bzw in klinischen Studien getestet wurden. (Abbildung aus Duffy et al., 2020 adaptiert (86))

Neben den präventiven Maßnahmen und der medikamentösen Behandlung wurde schon in den frühen 1960er Jahren mit ersten Versuchen zur Entwicklung von Impfstoffen in Form von durch Bestrahlung geschwächten Sporozoiten begonnen (207). Heute werden die unterschiedlichen Vakzine nach ihrem Angriffspunkt im Entwicklungszyklus des Parasiten kategorisiert (Abbildung 2)(86, 131, 186).

Prä-erythrozytische Vakzine (PEVs) haben den Vorteil, dass sie in frühen Stadien der Infektion der Leber wirken und somit die Entwicklung blockieren und infolgedessen die weitere Verbreitung (165). PEVs sollen eine Antikörperbildung gegen Oberflächen-Antigene der Sporozoiten induzieren, welches bei einer Infektion von wenigen

Hepatocyten zu einer vollständigen Auslöschung der prä-erythrozytischen Stadien der Leber führen kann (86). Wirkstoffe dieser Klasse enthalten entweder behandelte bzw. genetisch attenuierte Sporozoiten oder antigene Untereinheiten des Circumsporozoiten Proteins (131, 211).

Seitdem die Sequenz für das Gen des Circumsporozoiten Proteins (CSP) bekannt ist, liegt es im Fokus für die Entwicklung für Impfstoffe gegen dessen Untereinheiten (67). Der erste zugelassene Malaria-Impfstoff ist das RTS,S, welches ein monovalenter rekombinanter Impfstoff gegen eine Untereinheit des CSP ist. Er besteht aus einem verkürzten CSP fusioniert mit dem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (S) und dient somit als Träger für das CS-Antigen und das immunologische Adjuvans (AS01) (12). In Feldversuchen bei Menschen in Afrika zeigte dieser Impfstoff einen Schutz von 30-50% (7, 12, 230). Auf dieser Grundlage hat die WHO den Impfstoff für den Einsatz in Afrika zugelassen (214).

Weitere Angriffspunkte für Impfstoffe lassen sich im humanen Wirt während der Entwicklung der Parasiten in den Erythrozyten finden, sie zielen in den meisten Fällen auf das Blockieren der Invasion ab, um eine weitere asexuelle Reproduktion zu unterbinden (200). Hier handelt es sich zumeist um Vakzine, die eine Bildung von Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Merozoiten und variable Antigene auf der Erythrozytenmembran induzieren (217, 258, 277). In dieser Gruppe ist als vielversprechendster Kandidat der *Pf*RH5-Ripr-CyRPA-Komplex zu nennen, der eine essenzielle Rolle während der Wirtszellinvasion spielt (63, 218, 302, 313). In prä-klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass im Menschen neutralisierende Antikörper gegen *Pf*RH5 gebildet werden, die gegen die meisten genetischen Varianten wirken (47, 80).

Die dritte Kategorie von potentiellen Impfstoffen sind im Endwirt, dem Moskito, wirksam und sollen eine Transmission auf den Menschen verhindern (*Transmission blocking vaccines* (TBVs)), somit könnten sie nach Durchimpfung der gesamten Bevölkerung als langfristige Hilfe zur Verringerung der Weiterübertragung dienen (131, 255). Unter anderem sind die Ziele hier Antigene der Gameten, Zygoten und Ookineten und sollen somit die sexuelle Reproduktion und eine Weiterverbreitung der Malaria verhindern (12, 50).

Auch nach der Zulassung von RTS,S/AS01 besteht weiterhin die Notwendigkeit an weiteren möglichen Vakzin-Kandidaten zu forschen. Da es nicht ausreichend ist nur ein einziges wirksames Vakzin zur effektiven Malaria-Kontrolle zur Verfügung zu haben, sondern zukünftig weitere zu entwickeln und Vakzine generell als zusätzliche Hilfe zur Bekämpfung der Malaria anzuerkennen (93).

1.2 Biologie von *Plasmodium falciparum*

Obwohl es sich bei *P. falciparum* nicht um die erste beschriebene Malaria-verursachende Spezies handelt, liegt der Fokus der heutigen Forschung trotzdem hauptsächlich bei dieser Spezies (126, 269). Dies liegt vor allem daran, dass *P. falciparum* für den größten Teil der jährlichen Malaria-Todesfälle verantwortlich ist und weltweit über 90% der Erkrankungen verursacht (214). Ursache für diese Dominanz liegt sowohl in der Pathologie des Parasiten als auch der Verbreitung des Vektors, der *Anopheles gambiae* (257).

1.2.1 Lebenszyklus

Im Vergleich zu anderen humanpathogenen Erregern durchlebt *Plasmodium* einen komplexen Lebenszyklus indem der Parasit zwischen der asexuellen Vermehrung im humanen Zwischenwirt und einer sexuellen Reproduktion im Moskito wechselt (Abbildung 3).

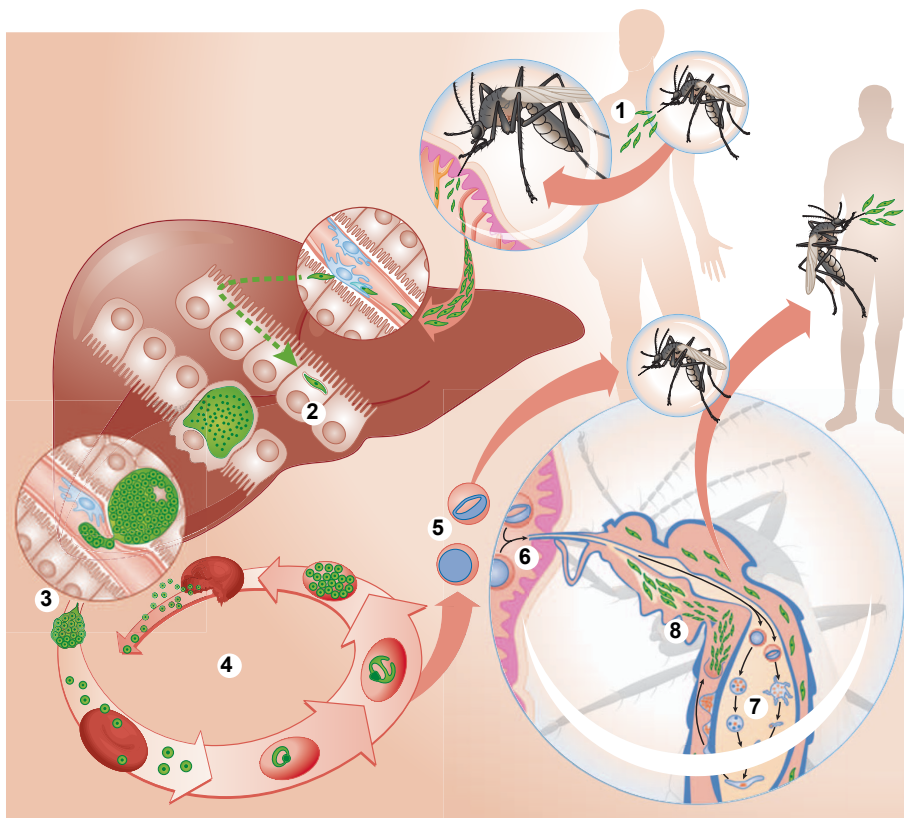


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *P. falciparum*. Der Erreger durchlebt einen komplexen Zyklus, beim dem er als Sporozoit durch einen Stich der Mücke auf den Menschen übertragen wird [1]. Als erstes durchdringt der Parasit die äußeren Hautschichten um ein Blutgefäß zu erreichen. Von dort aus gelangt er in die Leber in der er sich nach Durchwandern mehrerer Hepatozyten in einem niederlässt und sich dort durch Replikation rapide vermehrt. [2]. Die Merozoiten werden als kleine Merosomen „Päckchen“ in den Blutstrom entlassen und infizieren rote Blutzellen[3]. In den Blutzellen entwickeln sich die Parasiten von Ringen über Trophozoiten zu Schizonten, die schließlich durch Teilung die Merozoiten bilden. Am Ende des Zyklus werden die

Merozoiten aus der Blutzelle entlassen und können weitere Blutzellen infizieren [4]. Ein Teil der Merozoiten wechselt von der asexuellen Replikation in die sexuelle Entwicklung und differenziert sich zu Gametozyten aus. Diese können dann über einen weiteren Stich einer Mücke über das Blut wieder aufgenommen werden. Und nach einer Entwicklungsphase in der Mücke wieder auf den Menschen übertragen werden [5]. In der Mücke gelangen die Gametozyten in den Verdauungstrakt und durchlaufen dort eine sexuelle Replikation die in der Bildung von Tochtorsporozoiten endet [6]. Die Sporozoiten gelangen über den Speichel in die Haut des Menschen [7] (Abbildung aus Portugal et al., 2011 (223)).

Wird ein Mensch von einer infizierten weiblichen Mücke gestochen, so gelangen die Sporozoiten über den Speichel in die Haut und bewegen sich von dort hauptsächlich durch die extrazelluläre Matrix in Richtung Blutgefäße (247). Nach Eindringen in die Blutgefäße werden die Sporozoiten vom Blutsstrom in Richtung Leber transportiert, dort adhären sie an die Endothelzellen und gelangen so meist über die Kupffer-Zellen, die Makrophagen der Leber, in die darunter liegenden Hepatozyten (Abbildung 4)(191).

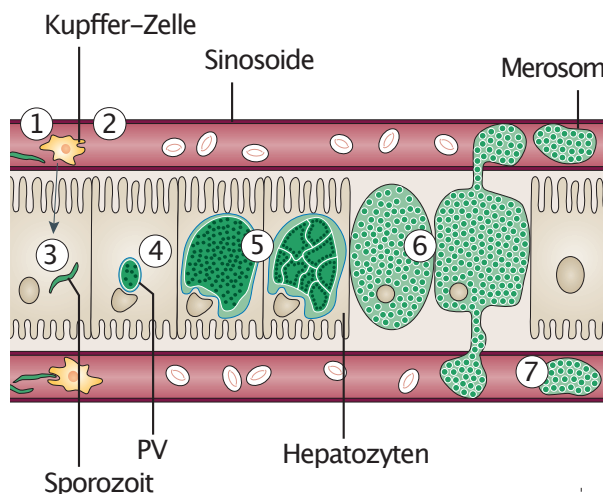


Abbildung 4 Asexuelle Leberstadien von *P. falciparum*. Die Sporozoiten gelangen über die Sinusoide zur Leber [1] und durchwandern Kupffer- oder Epithelzellen [2] bevor sie die Hepatozyten erreichen. Nach dem Durchqueren mehrerer Zellen kommt es zur finalen Invasion und der Bildung der parasitophoren Vakuole [4]. Innerhalb dieser Vakuole kommt es zu einer massiven Vermehrung durch asexuelle Replikation [5]. Am Ende des Replikationszyklus verursacht der Parasit einen Apoptose-artigen Zelltod [6] und die Merozoiten werden in Form von Merosomen in den Blutstrom entlassen [7]. (Abbildung adaptiert aus De Niz et al., 2017 (71))

Nach dem durchwandern mehrerer Hepatozyten wandern die Sporozoiten schlussendlich aktiv in eine Zelle ein (201). Hierbei bildet sich durch Invagination der Wirtszellmembran die sogenannte parasitophore Vakuole (PV) innerhalb derer sich der Parasit durch asexuelle Replikation vermehrt (22). Während dieser Entwicklung modifiziert der Parasit die umgebende parasitophore Vakuolenmembran (PVM), die sich bei der Invagination aus der Wirtszellmembran ableitet, durch die Einlagerung von Lipiden und Proteinen (267). Zum Verlassen der Hepatozyten am Ende der Leberphase induziert der Parasit einen Apoptose-artigen Zelltod, in Folge dessen tausende

Merozoiten in kleinen membranumhüllten Wirtszellvesikeln, den Merosomen, in den Blutstrom entlassen werden (267). Diese Entwicklung vom Sporozoiten bis zum Merozoiten dauert im Schnitt etwa 5 bis 7 Tage und verläuft asymptotisch. Einige *Plasmodium* Spezies, insbesondere *P. ovale* und *P. vivax*, sind in der Lage Ruhestadien, sogenannte Hypnozoiten, zu bilden.

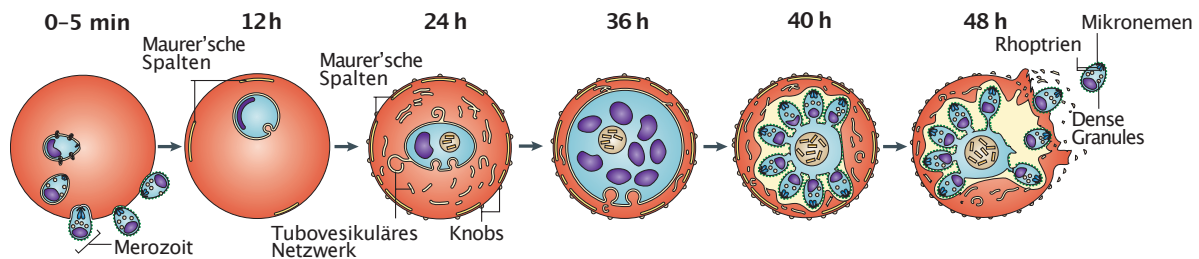


Abbildung 5 Asexuelle Entwicklung von *P. falciparum* im Erythrozyten. Während seiner intrazellulären Entwicklung von der Invasion der Merozoiten und deren Reifung vom Ringstadium bis hin zum Schizonten, unterzieht der Parasit seine Wirtszelle weitreichenden Modifikationen. Innerhalb der ersten 24 h bilden sich die Maurer'schen Spalten, Knobs und ein tubovesikuläres Netzwerk aus. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Reihe von asynchronen Zellteilungen und schlussendlich nach etwa 48 h zu Tochtermerozoiten, die eine Ruptur Wirtszelle veranlassen um diese verlassen zu können. (Abbildung adaptiert aus Maier et al., 2009 (179))

Über den Blutstrom bis in die Lungenkapillaren gelangte Merosomen setzen dort die Merozoiten frei, die sich sofort mittels ihrer Oberflächenproteine an die Erythrozyten anheften, sich mit Richtung ihres apikalen Pols zur Zelloberfläche reorientieren und unter Ausbildung einer PVM in die Zelle invadieren (261). Direkt nach der Invasion nimmt der Parasit eine flache scheibenförmige Ringform an, in dessen Rand aus Cytoplasma sich die meisten Organellen, wie Nucleus, Mitochondrium, Apicoplast und Endoplasmatisches Reticulum (ER) befinden, und einer dünneren nur wenige Strukturen enthaltenden Mitte (5, 163). Nahe des Nucleus befindet sich eine Ansammlung von Vesikeln, rauem und glattem ER, die eine Golgi-ähnliche Struktur bilden (20).

Innerhalb der PVM beginnt der Parasit nun zu einem Trophozoiten zu wachsen, währenddessen sich ausgehend von der PV ein röhrenförmiges Netzwerk durch das Cytoplasma bis zur Oberfläche des Erythrozyten ausbildet, das zum Im- und Export von Proteinen und Nährstoffen dient. Zudem beginnt der Nucleus sich durch Mitose zu multiplizieren, allerdings findet diese asynchrone Mitose ohne Zellteilung statt, so dass nach mehreren Kernteilungsrunden ein mehrkerniger Schizont entsteht (190). Parallel vergrößert sich das ER bis es netzartig den Schizonten durchspannt, die Anzahl der Ribosomen erhöht sich um ein vielfaches und Mitochondrium und Apicoplast beginnen durch einzelne Verästelungen sich rund um die einzelnen Nuclei zu wickeln (20, 289). Die einzelnen Merozoiten entstehen aus einer Reihe von Zentren, in denen alle Organellen gleichmäßig auf die bis zu 32 Tochtermerozoiten aufgeteilt werden, die dann schlussendlich den Erythrozyten verlassen (Abbildung 5)(20, 114).

Während dieser intrazellulären Entwicklung werden von dem Parasiten grundlegende Veränderungen in der Morphologie, Physiologie und Funktion der Wirtszelle induziert, um das Überleben des Parasiten zu gewährleisten (Abbildung 5). Hierfür werden gezielt Proteine ins Cytosol und auf die Wirtszelloberfläche gebracht (66, 299). Die Remodellierung der Wirtszelle ermöglicht dem Parasiten auch die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Wirts-Cytoplasma durch Endozytose, wie Hämoglobin aus dem die benötigten Aminosäuren gewonnen werden. Hierfür wird eine Nahrungsvakuole (*Food Vacuole* (FV)) gebildet in der das toxische Abbauprodukt des Häm in Form von kristallinem Hämozoïn eingelagert wird (79). An der äußeren Membran der Erythrozyten kommt es durch exportierte Proteine wie Knob-associated Histidin-rich Protein (KAHRP) und Erythrocyte Membrane Protein 1 (EMP1) zur Ausbildung sogenannter *Knobs*, die eine Adhäsion an die Endothelzellen der Blutgefäße ermöglichen. Hierdurch entgeht der Parasit der Passage durch die Milz und dem dortigen Abbau. Gleichzeitig sind jedoch letale Komplikationen, die durch die Unterversorgung von Organen mit Sauerstoff auftreten (cerebrale und placentäre Malaria), mit diesem Phänotyp assoziiert (85, 128). Binden infizierte Erythrozyten anstatt an Endothelzellen an nicht-infizierte Blutzellen, so spricht man vom *Rosetting* wodurch unter anderem für die Reinvasion die räumliche Nähe zu weiteren Blutzellen sichergestellt wird und die Effizienz zur Invasion gesteigert werden kann (303, 304). Nach etwa 48 h verlassen die Merozoiten durch einen streng regulierten Prozess, den Egress, die Wirtszelle indem sie von innen nach außen die einzelnen Membranen durchbrechen und neue Wirtszellen infizieren (270).

Im Gegensatz zu den anderen Stadien, ist der Merozoit das einzige, welches sich kurzzeitig außerhalb der Erythrozyten frei in den Blutgefäßen befindet und somit dem Immunsystem des Wirtes ausgesetzt ist. Die polaren Zellen sind trotz ihrer geringen Größe (1,2 μm) vollständig ausgestattet, um die ursprüngliche Wirtszelle zu verlassen, zur Reinvasion eine neue Zelle zu finden und dort sofort den Entwicklungszyklus wieder zu starten. Die für die Invasion notwendigen sekretorischen Vesikel, eine Vielzahl an Ribosomen, das Mitochondrium und der Apicoplast sind im apikalen Teil lokalisiert, während der Nucleus basal ausgerichtet ist. An der Oberfläche befindet sich eine Schicht aus Proteinen, die wichtig für die Invasion und zum Schutz vor dem Immunsystem sind (163). Zu den apikalen Organellen werden die zwei birnen-förmigen Rhoptrien, die umgebenden länglichen Mikronemen und die *Dense Granules* gezählt, die während der Invasion die enthaltenen Proteine sekretieren in Folge dessen die Form und Zusammensetzung der Wirtszellmembran verändert wird (20).

Nach der erfolgreichen Invasion verbleibt ein Großteil der Merozoiten im asexuellen Replikationszyklus, wohingegen ein kleiner Teil diesen verlässt und sich zu geschlechtlichen Gametozyten differenziert (Abbildung 6).

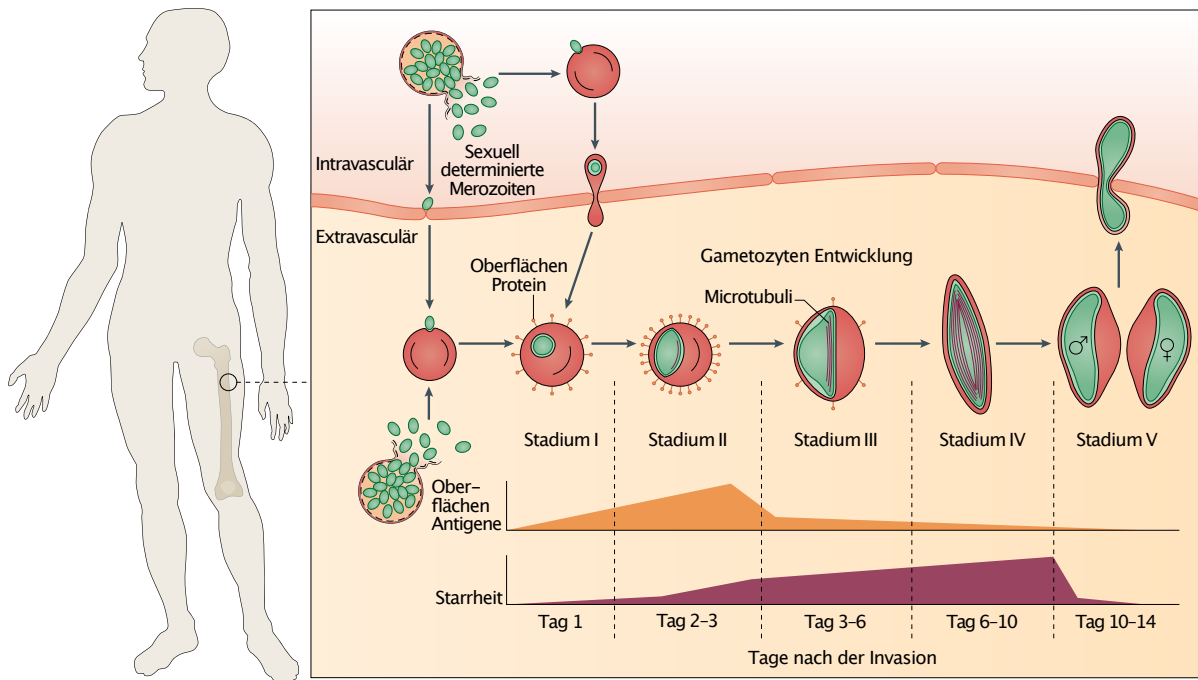


Abbildung 6 Sexuelle Entwicklung von *P. falciparum*. Am Ende eines jeden Replikationszyklus geht ein kleiner Teil der Schizonten in die sexuelle Entwicklung über. Die sexuell determinierten Merozoiten und frühe Gametozyten (grün) gelangen in das Knochenmark und entwickeln sich dort im Parenchym. Alternativ können sich Gametozyten auch aus Schizonten direkt im Parenchym bilden. Die Entwicklung im Knochenmark erfolgt von Stadium I bis IV. In den ersten beiden Stadien führt der Umbau der Wirtszelle (rot) zu einer Einlagerung von Antigenen an der Wirtszelloberfläche (orange Kurve) und zu einer Zunahme der Starrheit (violette Kurve). Nachdem die Zelle im Stadium V wieder an Verformbarkeit zugenommen hat, verlässt sie das Knochenmark und migriert zurück in den Blutkreislauf, wo der Gametozyt bei einem Stich von einem Mosquito aufgenommen werden kann. (Abbildung adaptiert aus Josling et al., 2018 (298))

Die sexuell determinierten Ringe sind nicht von asexuellen Ringen unterscheidbar, genauso gleichen Stadium I Gametozyten den asexuellen Trophozoiten. Äquivalent zum asexuellen Replikationszyklus verstoffwechseln Gametozyten Hämoglobin und lagern das gebildete Hämozoïn in einer FV ein, aber im Gegensatz zur Schizogonie findet während der Gametozytogenese keine DNA-Replikation und Kernteilung statt (129). Das Stadium II ist gekennzeichnet durch eine Veränderung der zellulären Architektur durch Ausbildung des inneren Membrankomplexes (IMC) unterhalb der parasitären Plasmamembran (PPM) und einem Cytoskelett aus Mikrotubuli, was eine Streckung des Parasiten zur Folge hat (74). Im Stadium III erreicht der Parasit dann ein Länge-Breite-Verhältnis von 2:1 und die Form ähnelt einem D (77). Seine maximale Länge von etwa 12 µm erreicht der Parasit in Stadium IV, die Wirtszellmembran ist zu diesem Zeitpunkt nur noch eine dünne Hülle, da das gesamte Hämoglobin aufgebraucht wurde (129). Mit dem Übergang zu Stadium V löst sich das Mikrotubuli-Netzwerk auf, die zuvor an den Enden spitz zulaufenden Gametozyten runden sich ab und das Länge-Breite-Verhältnis nimmt ab, der Parasit wird insgesamt wieder leichter verformbar (74). In diesem Stadium lassen sich weibliche Mikrogametozyten und männliche Makrogametozyten neben

eigenständigen Proteomen und Transkriptomen durch die Verteilung des Hämozoins im Parasiten unterscheiden (164).

Ähnlich zu den asexuellen Stadien, bei denen nur mit Ringen infizierte Blutzellen im peripheren Blut festzustellen sind, zirkulieren nur vollständig maturierte Gametozyten (Stadium V) frei in den Blutgefäßen, während die anderen Stadien hauptsächlich im Knochenmark zu finden sind (95, 148, 259, 280). Durch ihre hohe Verformbarkeit sind sie zusätzlich in der Lage auch Engstellen zu passieren und der mechanischen Retention in der Milz zu entgehen, wodurch sie dem Moskitovektor mehrere Tage zur Verfügung stehen (282). Nach der Aufnahme, während einer Blutmahlzeit durch einen Mosquito, gelangen diese dort in den Verdauungstrakt, was zu ihrer Aktivierung zu Gameten führt. Hierfür sind in erster Linie drei Faktoren verantwortlich: ein Temperaturabfall, das Ansteigen des pH Wertes und die Anwesenheit von Xanthurethinsäure (29). Die aktivierten Gameten verlassen die Blutzellen und formieren sich zu männlichen Mikrogameten und weiblichen Makrogameten und verschmelzen letztendlich zu einer Zygote. Innerhalb eines Tages wird die Zygote zu einer mobilen, invasiven Ookinete, die das Darmepithel durchquert und sich außerhalb zu einer Oocyste weiterentwickelt, in der sich durch asexuelle Reproduktion Sporozoiten bilden (246, 300). Nach 10 bis 12 Tagen werden aus der ruptierten Oocyste tausende von Sporozoiten in die Hämolymphe entlassen, gelangen von dort in die Speicheldrüsen und können über den Speichel einen neuen Zwischenwirt infizieren (246, 300).

Durch den Wechsel zwischen den Wirten ist der Parasit während seines Lebenszyklus sich ständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Um jederzeit an die Bedingungen angepasst zu sein und die unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu durchlaufen, verfügt der Parasit über wiederkehrende streng regulierte Prozesse die durch die Expression unterschiedlicher Proteine gesteuert werden. Generell lassen sich, während der Parasit seinen Lebenszyklus durchläuft, klar voneinander unterscheidbare Transkriptome und Proteome feststellen (139). Vergleichende Untersuchungen der Proteome zeigten, dass etwa 49% der Sporozoiten Proteine nur in diesem Stadium exprimiert werden und nur etwa 6% der Proteine wurden in allen untersuchten Stadien (Sporozoiten, Trophozoiten, Merozoiten und Gametozyten) exprimiert (105). Auch während der asexuellen Stadien lassen sich unterschiedliche Transkriptions Muster finden, woraus sich schließen lässt, dass Genexpression ein streng regulierter Prozess ist und Gene nur exprimiert werden, wenn die codierten Proteine nötig sind (34).

1.2.2 Grundlagen der Regulation der Transkription in *P. falciparum*

Die Lebensweise von *P. falciparum* ist gekennzeichnet durch einen komplexen Lebenszyklus und einem ständigen Wechsel zwischen zwei Wirten. Dadurch ist der Parasit auf die Fähigkeit angewiesen, sowohl rasche Wechsel zwischen unterschiedlichen

morphologischen Stadien zu vollziehen als auch eine längerfristige Variation der Antigene zur Aufrechterhaltung der Infektion im humanen Wirt zu erzielen (192). Um dies zu erreichen ist eine dynamische Genexpression notwendig, die jederzeit an auftretende Umweltveränderungen und die einzelnen Entwicklungsstadien anpassbar ist. Trotz intensiver Forschung sind nicht alle zugrunde liegenden Mechanismen zur Regulation endgültig aufgeklärt, jedoch ist bekannt, dass *P. falciparum* in der Lage ist, die Genexpression auf verschiedenen Leveln zu kontrollieren und verschiedene Arten der Regulation miteinander zu kombinieren, hierzu gehören Transkriptionsfaktoren (TGFs), nicht-codierende RNA-Transkripte (*non-coding RNAs* (ncRNA)) und epigenetische Regulation (58, 139).

Das AT-reiche Genom von *P. falciparum* besteht aus 23,2 Megabasen mit etwa 5300 annotierten Genen verteilt über 14 Chromosomen (30). Die meisten der Gene werden während der Entwicklung im Erythrozyten in einem zeitabhängigen, periodischen Transkriptionsmuster exprimiert, mit einem Anstieg der Transkription während des Trophozoiten und Schizonten Stadiums (137). Dies zeigt sich auch in wiederkehrender Korrelation individueller Transkriptome mit spezifischen Entwicklungsstadien (250). Neben diesen Transkriptionsmustern gibt es eine Reihe von Wirt-Parasit Interaktions-assoziierten Genen, die eine klonal variante Genexpression aufweisen, was bedeutet, dass sie in einzelnen Parasiten exprimiert werden, in anderen genetisch identischen jedoch nicht. (58) Während der asexuellen Replikation werden diese im aktiven bzw. inaktiven Status befindlichen Gene klonal auf die nächste Generation übertragen, wobei Wechsel zwischen aktiv und inaktiv mit einer geringen Häufigkeit auftreten. Dies kann dann zu phänotypischer Veränderung, wie unterschiedlichen Antigenen in den einzelnen Lebensphasen des Parasiten führen. Im Vergleich zu anderen eukaryotischen Organismen sind die meisten konservierten Elemente des Transkriptionsapparats in *P. falciparum* ebenfalls vorhanden, allerdings mit einigen Parasiten-spezifischen Elementen (1).

Hierzu gehört auch der Mechanismus zur spezifischen Kontrolle der Transkription über trans-aktivierende Faktoren, wie die TFs, und cis-regulatorischen Elemente an Promotor Regionen reguliert (139). Im Genom von *P. falciparum* sind verglichen mit anderen Eukaryoten, mit einer ähnlichen Genomgröße, eine verschwindend geringe Anzahl an spezifischen TF-codierenden Genen zu finden (116). Die Hauptfamilie der TFs, die ApiAP2s, welche homolog zu den Apetala/Ethylensignal-antwortenden Faktoren in Pflanzen sind, sind eine Apicomplexa-spezifische Familie mit 27 Mitgliedern, von denen ein Großteil in der Lage ist spezifische DNA-Motive zu erkennen (18, 48). Etwa für die Hälfte wird angenommen, dass sie essentiell für die intra-erythrozytäre Entwicklung sind, zudem zeigen viele eine Stadien-spezifische Expression (283). So sind ApiAP2

Faktoren Teil der Prozesse, die zur Entwicklung von Ookineten führen, die Entwicklung in den Leberstadien und der Gametozyten-Entwicklung (152, 197, 316, 317).

Eine Schlüsselrolle in der Regulation und Steuerung überlebenswichtiger Prozesse spielt die epigenetische Regulation der Genexpression. Der Parasit ist hierdurch in der Lage Nährstoffaufnahme, den Status klonal exprimierter Gene (z.B. Antigene) zu verändern und die sexuelle Differenzierung zu steuern (58). Der Begriff Epigentik beschreibt eine vererbare, reversible Änderung des Phänotyps durch Veränderung der Chromatinstruktur, die zur Aktivierung bzw. Stummschaltung von Genen führt, ohne die codierende Sequenz zu beeinflussen. Im Nucleus liegt das Chromatin in zwei Formen vor. Das relativ locker organisierte Euchromatin, in dessen Form der größere Teil des Genoms vorliegt, erlaubt die Transkription der in dieser Region codierten Gene (15, 233). Die dichtere Struktur des Heterochromatins ist gekennzeichnet durch eine hohe Nukleosomdichte, Histon-Deacetylierungen und an Lysin 9 trimethyliertem Histon 3 (H3K9me3) (15, 194). Hierzu gehören vor allem die Telomerenden, einige H3K9me3 und Heterochromatin Protein 1 (HP1) assoziierter Loci und eine kleine Anzahl parasitenspezifischer Genfamilien, die in einem oder mehreren Heterochromatinclustern in der Peripherie des Nucleus organisiert sind (15, 109, 110, 177). Die Organisation der DNA in Nukleosomen ist dynamisch und verändert sich während des Zellzyklus, hierbei korrelieren Transkriptionsaktivität und Chromatinkondensation. Zudem weist die Chromatin- und Nukleosom-Organisation eine geringere Stabilität, als bei höheren Eukaryoten auf, was eine erhöhte Zugänglichkeit des Genoms zur Folge hat (42, 171). Außerdem verfügt *P. falciparum* zusätzlich zu den vier kanonischen Histonen über vier Histon-Varianten (H2A.Z, H3B.Z, H3.3 und CenH3) (84). Grundlage für diese epigenetischen Veränderungen sind Histon-modifizierende Enzyme, zu denen eine Reihe von Histon-Deacetylasen (HDACs), Histon-Acetyltransferasen (HATs), Methyltransferasen und Demethylasen gehören, deren Modifikationen der Histone durch Anfügen bzw. Entfernen von Acetyl- und Methylgruppen an unterschiedliche Lysine zu einem posttranslationalen Muster (PTM), dem „Histon Code“, führen (154, 301). In *P. falciparum* wurden eine Reihe dieser Histon-modifizierenden Enzyme identifiziert (65). Zu den HATs gehören unter anderem GCN5, ein Homolog zum GCN5, das in Hefe an der Chromatinmodellierung beteiligt ist und mit der Genaktivierung assoziiert ist (94, 224). An der Deacetylierung acetylierter Lysine an Histone 3 und 4 ist das HDAC-Homolog Silent Information Regulator 2 (SIR2) beteiligt, welches an Promotoren von nicht-aktiven *var* Genen (*Variant Surface Antigens*) gefunden wurde (193). Neben den Histon-modifizierenden Enzymen, gibt es Chromatin-assoziierte Faktoren, hierbei handelt es sich um Proteine, die spezifisch Histon-modifikationen erkennen und infolgedessen die Rekrutierung von *Chromatin-remodelling* Komplexen und des Transkriptionsapparats gefördert wird (135). HP1 gehört in die Klasse der Proteine, die diesen „Histon-Code“

lesen können. Das Protein mit einer N-terminalen Chromo-Domäne erkennt und bindet H3K9me3 Modifikationen zur Steuerung von Heterochromatin-Ausbildung und ist unter anderem assoziiert mit *var* Genen und *ap2-g* (35). Ein anderer Mechanismus liegt der Funktionsweise des Bromodomain Protein 1 (BDP1) zugrunde, welches unter Komplexbildung mit einem weiteren Bromo-Domänen Protein (BDP2) und dem DNA-bindenden Protein AP2-I reguliert (234). BDP2 und AP2-I sind Gene, die in Zusammenhang mit der Invasion stehen. Außerdem wurde im Zusammenhang mit *var* Genen und *gdv1* eine Beteiligung verschiedener *long noncoding RNAs* (lncRNAs) nachgewiesen (37, 103). Die ncRNAs können ubiquitär in hoher Zahl während des Lebenszyklus gefunden werden (27, 37, 176, 248). In den meisten Fällen handelt es sich um antisense Transkripte, aber auch Transkripte in sense Richtung und intergener Regionen sind möglich. Die ncRNAs ermöglichen *P. falciparum* trotz der relativ geringen Anzahl von TFs und dem Fehlen eines RNA Interferenzsignalwegs (RNAi) streng regulierte Expressionskaskaden, indem sie u. a. die TFs selbst, deren Zielstellen oder beteiligte Proteine regulieren (116, 297).

Wie schon erwähnt ist es für *P. falciparum* innerhalb seines Lebenszyklus überlebenswichtig sich schnell an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, was er unter anderem durch die Regulation der Genexpression erreicht. Während der Entwicklung in den Erythrozyten des humanen Wirtes, handelt es sich bei Variation der Oberflächen-Antigene, dem Wechsel der Invasionsliganden, der sexuellen Differenzierung und der Nährstoffgewinnung um epigenetisch regulierte Prozesse.

An die Oberfläche des Erythrozyten exportierte Proteine sind durch Antikörper des Immunsystems erkennbar. Eine Möglichkeit der Immunantwort zu entgehen, ist die Expression unterschiedlicher Varianten eines Antigens. Die Familie der *var*-Gene besteht aus etwa 60 Mitgliedern, die für das EMP1 codieren, welches eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der infizierten Erythrozyten an die Endothelzellen und andere infizierte Erythrozyten spielt (304). Während ein einzelnes *var* Gene exprimiert wird, sind alle anderen *var* Gene stumm geschaltet, indem sie heterochromatisch mit H3K9me3 und H3K36me3 Markierung vorliegen (147, 177). Durch einen Wechsel der stumm geschalteten und aktivierten Gene werden unterschiedliche Varianten der Antigene an die Oberfläche exportiert (304). Ähnliche Wechsel der Genvarianten sind auch für die Mitglieder der RIFINs und STEVORs zu beobachten, wobei mehrere Gene der RIFIN-Familie im Gegensatz zu den *var* Genen auch gleichzeitig exprimiert werden (124, 166, 198, 205).

Ähnlich wie die Oberflächenantigene ist der Merozoit im Zeitraum zwischen Egress und Invasion direkt dem Immunsystem ausgesetzt. Die Invasion selbst ist ein Prozess, an dem eine Reihe von Proteinen beteiligt ist, die unter anderem spezifisch an bestimmte

Rezeptoren der Wirtszelle binden. Bei den Invasions-Liganden, die den Wirtszell-Tropismus sicherstellen handelt es sich um Proteine der *Reticulocyte Binding-like* Familie (RBL) und der *Erythrocyte binding-like* Familie (EBL) (60, 275). Die einzelnen Mitglieder dieser Familien können in ihrer Expression innerhalb der *Plasmodium* Spezies variieren (221). Bei *P. falciparum* gibt es eine Vielzahl spezifischer Parasit-Ligand und Wirtszell-Rezeptor Paarungen, die auch als alternative Invasionswege bezeichnet werden (26, 28, 73, 87, 145). Durch genetische Veränderungen der unterschiedlichen EBL und RBL Proteine, inklusive Sequenz-Polymorphismus und Anzahl der Genkopien (*Copy Number Variation* (CNV)) (88). So unterliegt u. a. das Protein Rh4 aus der Familie der RBL-Proteine, welches für den Sialinsäure-unabhängigen Invasionsweg notwendig ist, epigenetischer Kontrolle. Dies bedeutet, dass es nur in einer geringen Anzahl von Parasiten einer klonalen Population exprimiert bzw. die Expression in klonalen Linien hochreguliert wird, wenn auf der Oberfläche der Erythrozyten keine Sialinsäure vorhanden ist (117, 266).

Einer anderen Art der epigenetischen Kontrolle unterliegt *dblmsp2*, welches klonal in verschiedenen Varianten exprimiert werden kann (274). Vergleichbar mit den *var* Genen gibt es eine Multigenfamilie, die *clag* Gene, die für die RhopH1-Proteinfamilie codieren, bei der nur jeweils ein Gen der Familie exprimiert wird (55, 57). Die Proteine dieser Familie werden ebenfalls an die Oberfläche des Erythrozyten exportiert und es wird angenommen, dass sie an der Nährstoffaufnahme beteiligt sind, indem sie durch die Oberfläche der Erythrozyten führende Kanäle ausbilden (204). Auch bei den Mitgliedern der ACS-Familie, deren Gene Fettsäure-CoA-Synthasen codieren, lässt sich eine unterschiedliche Expression während des asexuellen Zyklus feststellen (229). Da die Gene dieser Familie am Fettstoffwechsel beteiligt sind, ist es möglich, dass die regulierte Expression eine Anpassung an das Nährstoffangebot des Wirts bedeutet (88).

Neben der Invasion ist der Wechsel zwischen asexueller und sexueller Entwicklung für den Parasiten einer der wichtigsten Prozesse zur Aufrechterhaltung des Lebenszyklus. Deshalb wechselt in jedem Zyklus ein Teil der Parasiten von der asexuellen Proliferation in die sexuell determinierte Entwicklung. Durch die Expression von *ap2-g*, das in asexuellen Parasiten stumm geschaltet ist, werden weitere Gene hochreguliert und der Parasit wechselt im darauffolgenden Zyklus in die Entwicklung zum Gametozyten (143, 152, 256).

1.2.3 Invasion

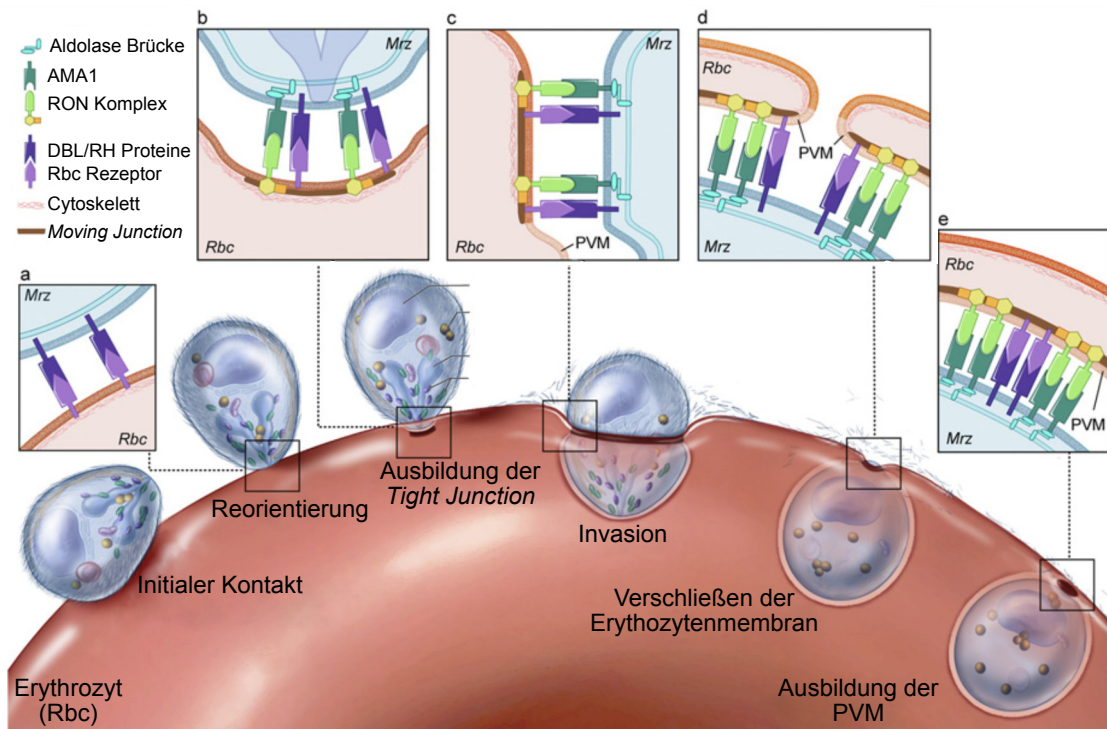


Abbildung 7 Schematische Darstellung des Invasionsprozesses. Nach einem ersten reversiblen initialen Kontakt des Merozoiten mit der Erythrozyten-Oberfläche, richtet sich der Merozoit mit dem apikalen Ende in Richtung der Wirtszelle aus und DBL- und RH-Proteine binden an Rezeptoren des Erythrozyten (a). Durch Ausbildung des AMA1-RON-Komplexes kommt es zur Ausbildung der Tight Junction (b), die während der eigentlichen Invasion des Parasiten als Moving Junction außen an der Oberfläche des Merozoiten entlang läuft (c), der Großteil der Oberflächenproteine verbleibt außerhalb der Wirtszelle („Shedding“). Nachdem der Parasit vollständig in die Wirtszelle eingedrungen ist, kommt es zur Bildung der PVM (d) mit nachfolgendem Verschließen der Invasionspore (e). (Abbildung adaptiert aus Geoghegan et al., 2021 (119))

Einer der entscheidenden Schritte, zur Aufrechterhaltung des asexuellen Replikationszyklus des Parasiten, der ebenfalls gekennzeichnet ist durch bestimmte Protein-Expressionsmuster, ist die Invasion von Erythrozyten durch Merozoiten. Es handelt sich um einen hochkomplexen Prozess, der durch ein Zusammenwirken verschiedener Proteine und Rezeptoren gesteuert wird (61, 140). Merozoiten sind innerhalb weniger Minuten in der Lage Erythrozyten zu finden und zu erkennen, wobei der eigentliche Prozess der Invasion nach dem initialen Kontakt in weniger als einer Minute abgeschlossen ist (33, 122). Der Zeitraum zwischen Egress und Re-Invasion ist die einzige Phase währenddessen der Parasit ungeschützt dem Immunsystems des Wirtes ausgesetzt ist, daher ist der schnelle Ablauf ein Weg einer Immunantwort zu entgehen (60).

Die Invasion lässt sich in mehrere chronologisch aufeinanderfolgende Phasen unterteilen (Abbildung 7): (I) Anheften der Merozoiten an die Erythrozyten, (II) der Merozoit richtet sich mit dem apikalen Ende in Richtung der Oberfläche aus, (III) in Folge von Ca^{2+} -Signalen

werden Invasionsliganden aus den Rhoptrien und Mikronemen ausgeschüttet und eine irreversible Bindung, die *Tight junction* entsteht, (IV) der Parasit wandert aktiv getrieben durch den Actin-Myosin-Motor ein, während verschiedene Spaltungen unter Beteiligung von Proteasen stattfinden und die PV durch Mitnahme der Erythrozyten-Membran geformt wird, (V) am Ende schließt sich die Invasionspore hinter dem Parasiten (90, 307).

Zu Beginn kommt es zu einem initialen reversiblen Kontakt zwischen dem Merozoiten und der Wirtszellmembran, welcher vermutlich durch GPI-verankerte Merozoite Surface Proteins (MSPs) vermittelt wird. Während viele MSPs an der Ausbildung der Merozoiten Oberfläche beteiligt sind, ist MSP-1 das größte und am häufigsten vorhandene Dimer (123). Zudem bildet MSP-1 einen großen Komplex mit einer Reihe von Proteinen, wie MSP6, MSP7, DBLMSP1 und DBLMSP2 (172). Da MSP-1 vermutlich nicht essenziell für die Invasion ist und nachgewiesen werden konnte, dass es eine Rolle während des Egress, in der durch SUB1 prozessierten Form, hat und mit dem Spectrin Cytoskelett interagiert, ist unklar welches der MSPs eine Rolle beim initialen Kontakt spielt (68). Ebenso ist es möglich, dass periphere und Oberflächenproteine nicht direkt in den Prozess der Invasion involviert sind, sondern eine Rolle beim Schutz des Merozoiten vor dem Immunsystem spielen (61). Während dieses reversiblen Kontaktes zwischen Merozoit und Erythrozyt ist der Parasit noch nicht fest an die Oberfläche des Erythrozyten gebunden und ist in der Lage seine Orientierung zu verändern, bis der apikale Pol der Wirtszelle zugewandt ist (308). Anschließend entsteht, durch aus Mikronemen und Rhoptrien sekretierten Adhäsine initiiert, die irreversible ring-ähnliche *Tight Junction*, die einen direkten Rezeptor-Ligand-Kontakt zwischen Merozoit und Wirtszelle darstellt (21)(Abbildung 7a und b). Die beteiligten Proteine u. a. EBA-175, EBA-181, EBA-140; EBL-1; Rh1; Rh2; Rh4 und Rh5 gehören zur Familie der EBL Proteine und den Reticulocyte-binding-like Protein Homologen (Rh) (61)(Abbildung 7 a). Die meisten dieser Proteine sind nicht essenziell für die Invasion, sondern ermöglichen unterschiedliche Invasions-Wege, eine Ausnahme bildet hierbei das Rh5, welches mit dem Rh5-interacting Protein (Ripr) und dem Cysteine-rich Protective Antigene (CyRPA) einen an den Rezeptor Basigin bindenden Komplex bildet (302, 308). Einen weiteren essenziellen Liganden während der Invasion stellt das Mikronemen-ständige Protein Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) dar, welches einen Komplex mit dem Rhoptry Neck Protein 2 (RON2) bildet und als Teil des *Tight Junction* bildenden RON-Komplexes in die Wirtszellmembran integriert wird (286)(Abbildung 7 b). Bei einem Großteil der Interaktionen und Proteinsekretierungen aus den apikalen Organellen handelt es sich um Ca^{2+} -abhängige Vorgänge (308). Mit der Ausbildung der *Tight Junction* startet die eigentliche aktive Invasion des Parasiten in die Wirtszelle, welche durch den Aktin/Myosin-gesteuerten Motorkomplex, das Glideosom

angetrieben wird. Das Glideosom besteht aus Glideosome-associated Proteins (GAPs) die ein Gerüst für die Interaktion des Aktins und Myosins mit der PPM und dem darunter liegenden IMC bilden (61). Beim Eindringen des Parasiten gleitet nun die *Tight Junction* in Form einer *Moving Junction* außen an der Oberfläche des Parasiten entlang, infolgedessen sich durch Einhüllung in die Erythrozytenmembran die PV formt und die meisten MSPs von der Oberfläche abgespalten werden (61, 136)(Abbildung 7 c). Beim Erreichen des hinteren Endes wird der Parasit vollständig von der Erythrozytenmembran umschlossen und die PVM wird durch ablösen von der Membran ausgebildet (21)(Abbildung 7 d und e).

An dem Prozes der Invasion sind eine Vielzahl essentieller und nicht-essentieller Proteine beteiligt, die teilweise auch einer epigenetischen Regulation unterliegen. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die molekularen Grundlagen der beteiligten Prozesse, einschließlich der Rezeptor-Ligand-Interaktion endgültig aufgeklärt. Im Fokus der Forschung stehen hier vor allem die essentiellen Proteine und die Komplexe in denen sie gebunden sind.

1.2.3.1 Cysteine-rich protective antigene (CyRPA)

Das Protein CyRPA ist Teil eines Komplexes der essenziell für die Invasion, die Ausschüttung von Ca^{2+} und die Ausbildung der *Tight Junction* ist (302). Im Parasiten bildet sich über die Bindung von Rh5 und Ripr an den entgegengesetzten Enden des CyRPA ein Komplex (313). Dieser Komplex ermöglicht die Bindung des c-terminalen Bereichs des Rh5 an Basigin, einem an der Oberfläche des Erythrozyten lokalisierten Rezeptor, der einen Anstieg der Ca^{2+} -Level im Inneren zur Folge hat (63, 302). Es wurde vermutet, dass der Komplex über eine Interaktion des n-terminalen Bereichs von Rh5 mit dem GPI-Anker des Protein P113 mit der PPM verbunden ist, was inzwischen allerdings angezweifelt wird (49, 112). Im Anschluss an die Ausschüttung des Ca^{2+} und verschiedener anderer Proteine bildet sich dann die *Tight Junction* aus (308). Während der Invasion bildet die Bindung von Ripr an den CSS-PTRAMP-Komplex (Cystein-rich small secreted protein und Thrombospondin-related apical merozoite protein) eine Art Brücke zwischen der Wirtszellmembran und der Parasitenmembran (97). Obwohl Merozoiten, die kein CyRPA bzw. Rh5 exprimieren an Erythrozyten binden können, ist diese Bindung nicht irreversibel und es findet keine Invasion statt (302). Sowohl CyRPA als auch Rh5 können Invasion-blockierende Antikörper induzieren (82, 315).

Für die ersten durchgeführten Studien wurde CyRPA ausgewählt, da vermutet wurde, dass es sich um ein Invasions-beteiligtes Merozoitenprotein handelt, dessen Transkription in späten asexuellen Stadien hochreguliert wird, ein n-terminales Sekretions-Signalpeptid enthält und der Genlocus in der Nähe anderer Invasions-

Proteine, wie Rh4, Rh5 und SURFIN4.2 liegt (25, 34, 118, 169, 311). Das Protein wird von einem 1188 bp langen Sequenz, die ein 99 bp Intron enthält, codiert. Der Locus befindet sich in der subtelomeren Region des Chromosom 4 (82). Neben dem n-terminalen Signalpeptid codiert *cyrpa* zwölf Cystein-Reste, die vermutlich an der Ausbildung von sechs Disulfidbrücken beteiligt sind (100). Während die durchschnittliche Sequenz Übereinstimmung von *PfCyRPA* mit seinen Orthologen im Genom von *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* und *P. reichenowi* bei etwa 42% liegt, ist die Sequenz hochkonserviert innerhalb einzelner *P. falciparum* Linien und es konnte nur an 13 Aminosäure Positionen ein Dimorphismus bei 227 Feldisolaten festgestellt werden (182).

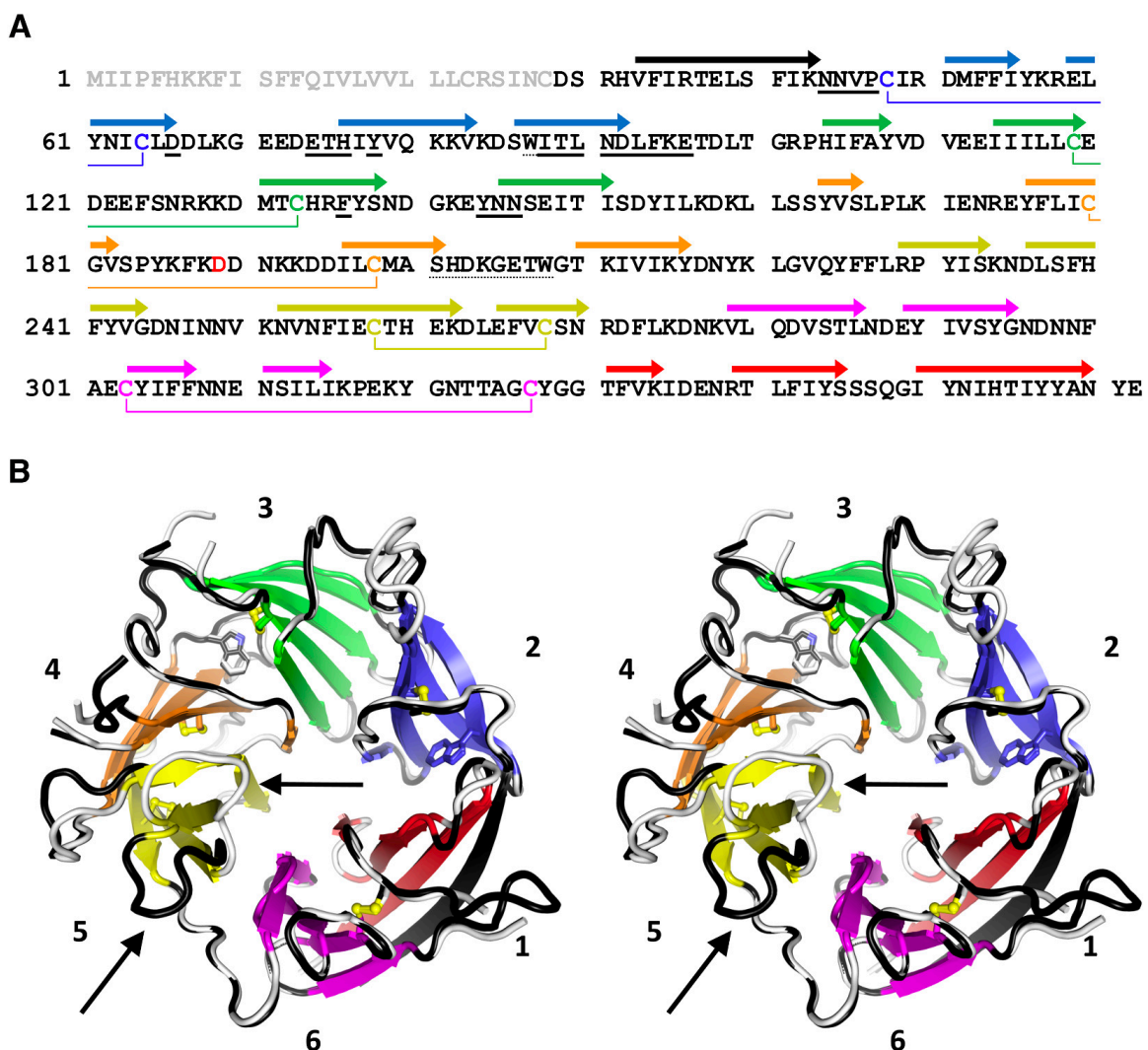
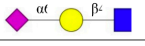
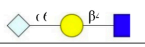
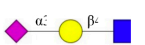

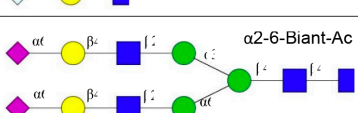
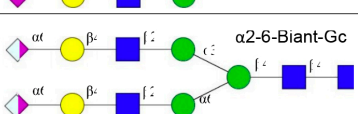







Abbildung 8 CyRPA Kristallstruktur (A) In der Aminosäuresequenz des Proteins sind die strukturellen Besonderheiten des CyRPA hervorgehoben. Die zur Sialidase-typische ASP-Box gehörenden AS sind schwarz gestrichelt unterstrichen, ebenso die beiden Trp-Reste. Die einzelnen β -Stränge sind durch Pfeile farblich korrespondierend zu dem jeweiligen Flügel, den sie innerhalb der Struktur bilden, markiert. Die zehn Disulfidbrücken ausbildenden AS der einzelnen Flügel sind farblich hervorgehoben und miteinander durch eine gleichfarbige Linie verbunden. Die schwarz unterstrichenen AS, gehören zum Epitop, welches durch den monoklonalen Antikörper C12 erkannt wird. (B) Darstellung der Struktur von CyRPA als Bändermodell, die einzelnen Flügel sind mit 1-6 vom

N-Terminus ausgehend durchnummeriert und farblich korrespondierend zu (A) dargestellt. Im Gegensatz zu den anderen fünf Flügeln besteht der erste aus einem n-terminalen (schwarz) und drei c-terminalen (rot) β -Strängen. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Protomere befinden sich im asymmetrischen Bereich des Moleküls und können sich in den beiden Konformationen des Proteins stark voneinander unterscheiden, die Schleifen sind hier in schwarz und weiß dargestellt. (Abbildung adaptiert aus Favuzza et al., 2017 (101))

Mittels Kristall-Struktur Analyse konnte für das aus 362 Aminosäuren bestehende und 42,8 kDa große Protein eine Disulfid-Brücken und Tryptophan-Reste verdeckende sechsflügelige β -Propeller Struktur bestimmt werden (Abbildung 8)(101). Die einzelnen Flügel bestehen aus einer viersträngigen antiparallelen β -Faltung, in der die Flügel 2 bis 6 einzeln durch die fünf Disulfidbrücken stabilisiert sind. Die Suche nach homologen Domänen zeigte, dass CyRPA eine stark modifizierte Sialidase/Neuramidase-Struktur annimmt und sich außerdem ein charakteristisches Motif für Sialidasen, die sogenannte ASP-Box (201-SHDKGETW-208), findet (82). Trotz der Sialidase-ähnlichen Faltung und der ASP-Box zeigt CyRPA aufgrund fehlender Reste für die Katalyse keine Sialidase-Aktivität. (101).

Glycan	PfCyRPA	PfCyRPA Y154H G209R	PrCyRPA
 α 2-6-SLN-Ac	32.3 nM ± 9.6	68.3 nM ± 3.1	64.3 nM ± 8.3
 α 2-6-SLN-Gc	1.87 μ M ± 0.16	89.6 nM ± 14	75.6 nM ± 7.4
 α 2-3-SLN-Ac	1.96 μ M ± 0.23	50.6 nM ± 13	43.9 nM ± 15
 α 2-3-SLN-Gc	3.12 μ M ± 0.79	43.6 nM ± 1.8	23.1 nM ± 10
 α 2-6-Biant-Ac	1.89 nM ± 0.47	21.7 nM ± 8.4	18.8 nM ± 9.5
 α 2-6-Biant-Gc	1.97 μ M ± 0.62	26.4 nM ± 10	13.9 nM ± 1.2

Sugar:  Neu5Ac  Neu5Gc  Gal  GlcNAc  Man





K_D:  <10 nM  10 nM–50 nM  50 nM–100 nM  >100 nM

Abbildung 9 Analyse der Bindungsstärke von CyRPA an Trisaccharide. Für die unterschiedlichen monomeren Trisaccharide (α -2,6-N-Acetylneuraminosyl-Galactosyl- β -(1,4)-Glucosamin, α -2,6-N-Glycolylneuraminosyl-Galactosyl- β -(1,4)-Glucosamin, α -2,3-N-Acetylneuraminosyl-Galactosyl- β -(1,4)-Glucosamin und α -2,3-N-Glycolylneuraminosyl-Galactosyl- β -(1,4)-Glucosamin) und die beiden dimeren Glykane sind die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) für *P. falciparum* (Pf), *P. reichenowi* (Pr) und der Doppelmutante in *P. falciparum* PfCyRPA154H/G209R aufgelistet. Die Daten stammen aus SPR-Assays, die in Triplikaten durchgeführt wurden, die Werte geben den Durchschnittswert inklusive der Standardabweichung an. Der Farbcode ist der Legende in der Abbildung zu entnehmen. (69)

Nachdem die Struktur aufgeklärt werden konnte und eine Reihe von inhibierenden Antikörpern untersucht wurden, wurde versucht die Interaktion von CyRPA mit dem

Erythrozyten zu charakterisieren (100). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass CyRPA sich aus einer Sialidase entwickelt und die enzymatische Aktivität im Laufe der Evolution verloren hat, aber eine Sialinsäure-Lektin-Aktivität bestehen geblieben ist um andere Funktionen zu erfüllen (69).

In Glycan Microarray-basierten Bindungsstudien konnte eine Präferenz zur Bindung von Sialinsäure-gebundenen Glykanen und hier insbesondere für das Trisaccharid α -2,6-N-Acetylneuraminosyl-Galactosyl- β -(1,4)-Glucosamin (Neu5Ac- α -(2,6)-Gal- β -(1-4)-GlcNAc (α 2-6-SLN-Ac)) (Abbildung 9). Interessanterweise handelt es sich bei Basigin und CD44 um Rezeptoren, die über N-gebundene Glykane verfügen(16), was sie zu einem möglichen Rezeptor für die Lektin-Aktivität von CyRPA macht. Unterstützt wird diese These, da CyRPA nicht an Erythrozyten bindet, die kein Basigin und CD44 exprimieren und das Entfernen von Sialinsäuren denselben Effekt auf CyRPA hat. Daher liegt die Vermutung nahe, das CyRPA vermittelte Bindung an humane Erythrozyten Sialinsäure-abhängig ist.

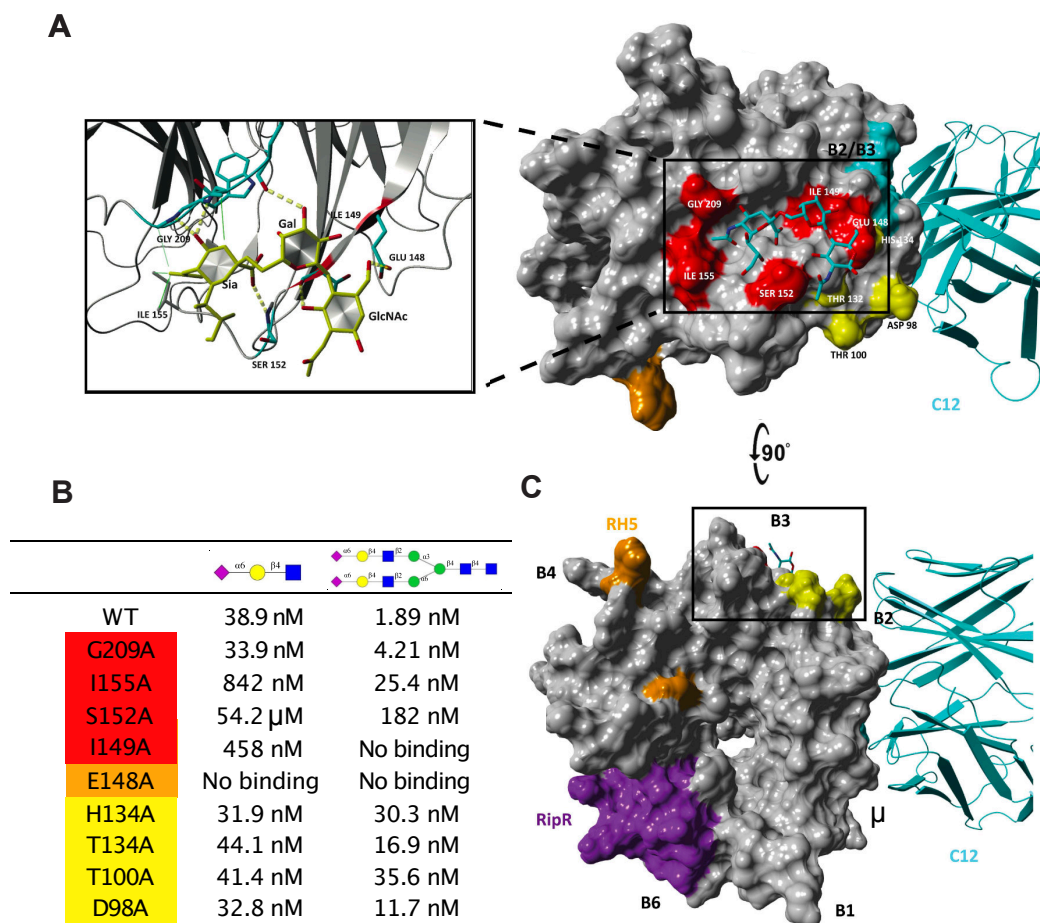


Abbildung 10 Molekulares Strukturmodell von CyRPA im Komplex mit mAK C12 und α -2,6-SLN-Ac. Dargestellt sind die Sialinsäure-Erkennungsregionen (Lektin-Bindestellen) des CyRPA gebunden an den Wachstums-inhibierenden mAK C12 auf Basis der Röntgen-Kristall-Struktur PDB 5EZN (10.2210/pdb5EZN/pdb). Die Lektin-Bindestellen sind in Rot (1) und Gelb (2), die von Ripr in Violett

und Rh5 in Orange markiert. (A) Detaillierte Ansicht der α -2,6-SLN-Ac Interaktion mit der Lektin-Bindestelle. Die zur Koordination der Bindung essentiellen AS Glu148, Ile149, Ser152, Ile155, und Gly209 sind beschriftet und die Wasserstoffbrückenbindung in Gelb eingezeichnet. (B) Aufgelistet sind die Affinitäten des CyRPA-WT und der CyRPAmut Varianten für das präferierte monomere bzw. dimere Glykan (α -2,6-SLN-Ac und α -2,6-Biant-Ac). Die CyRPAmut der ersten Lektin-Bindestelle sind rot unterlegt und die der zweiten in Gelb. Die orange unterlegte Variante ist Teil beider Bindestellen. Die Ergebnisse der SPR Assays stammen aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Wie (A) nur um 90° gedreht. Die einzelnen Flügel sind mit B1 bis B6 beschriftet. (69)

Im weiteren Verlauf wurden zwei mögliche Lektin-Bindestellen über molekulare *in silico* Modellierung identifiziert und bei einer der beiden Bindestellen, Aminosäurereste des zweiten und dritten Flügels als Hauptinteraktionspartner identifiziert (Abbildung 10 A). Ein Austausch dieser Aminosäuren gegen Alanin und darauffolgende Bindestudien zeigten einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Bindeaffinität. Außerdem konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Rh5-CyRPA-Bindung inhibierenden Antikörpern (82, 100), Wirkstoffe, die die CyRPA-Lektin-Aktivität blockieren auch die Proliferation verhindern. Bisher wurde angenommen, die essentielle Funktion von CyRPA sei darin begründet, dass es in dem Komplex eine Brücke zwischen Ripr und Rh5 bildet. Die nachgewiesene Lektin-Aktivität und die Inhibierung des Wachstums, wenn diese blockiert ist, sprechen für eine wesentlich komplexere Funktionsweise des Proteins.

1.2.4 Sexuelle Differenzierung: Der Wechsel von asexueller Proliferation zu sexuell determinierter Entwicklung

Neben der asexuellen Entwicklung im humanen Zwischenwirt ist die Transmission von *Plasmodium* zum Endwirt, den Moskitos, essentiell zur Aufrechterhaltung des Lebenszyklus des Parasiten. Da die asexuellen Stadien nicht auf den Moskito übertragbar sind, ist hierfür die Entwicklung von männlichen und weiblichen Gametozyten aus den asexuellen Vorstufen notwendig. Dieser Prozess wird als Gametozytogenese bezeichnet, dessen Notwendigkeit für die Transmission schon Ende des 19. Jahrhunderts von Alphonse Laveran und Ronald Ross in Blutproben von Patienten beobachtet und beschrieben wurde (168, 228). Trotz andauernder Forschung in diesem Bereich ist der genaue Mechanismus, der zum Prozess der sexuellen Differenzierung führt, noch nicht endgültig aufgeklärt.

Die Gametozytogenese lässt sich in zwei Stufen unterteilen, zum einen das sexuelle Commitment, bei dem sich der Parasit irreversibel auf eine sexuelle Entwicklung festlegt und die sexuelle Konversion, bei welcher der Parasit vom Ringstadium über die einzelnen Stadien zu einem männlichen oder weiblichen Gametozyten maturiert (Abbildung 11)(252). Es wurde ursprünglich angenommen, dass die Determinierung zur sexuellen Entwicklung zu Beginn der Schizogonie stattfindet und somit alle Merozoiten eines

Schizonten entweder im asexuellen Zyklus verbleiben oder in die sexuelle Entwicklung übergehen, was als *Next Cycle Conversion* (NCC) bezeichnet wird (38). Inzwischen wurde allerdings nachgewiesen, dass sexuelles Commitment auch im frühen Ringstadium induziert werden kann und der Parasit sofort in die sexuelle Entwicklung ohne vorherige asexuelle Replikation wechselt, dies wird als *Same Cycle Conversion* (SCC) bezeichnet (19). Unabhängig davon, ob es sich um NCC oder SCC handelt, gehen in jedem Zyklus nur eine kleine Subpopulation von Parasiten in die Gametozytogenese über. Wodurch dies beeinflusst wird, ist immer noch Gegenstand der aktuellen Forschung und ist noch nicht endgültig geklärt (150).

Als ein Faktor wurde *in vitro* das Lysophosphatidylcholin (LysoPC) identifiziert, indem nachgewiesen wurde, dass der Parasit LysoPC als Hauptsubstrat für seinen Phospholipid Metabolismus nutzt und die LysoPC Verfügbarkeit somit als Sensor dient, dessen Limitierung in einer Verringerung der Tochtermerozoiten resultiert und die Differenzierung zu Gametozyten stimuliert (36). Die Sensitivität des Parasiten auf die LysoPC Konzentration, könnte außerdem eine Erklärung für das gehäufte Auftreten von Gametozyten in Geweben mit niedrigen Konzentrationen, wie dem Knochenmark, erklären (3, 148).

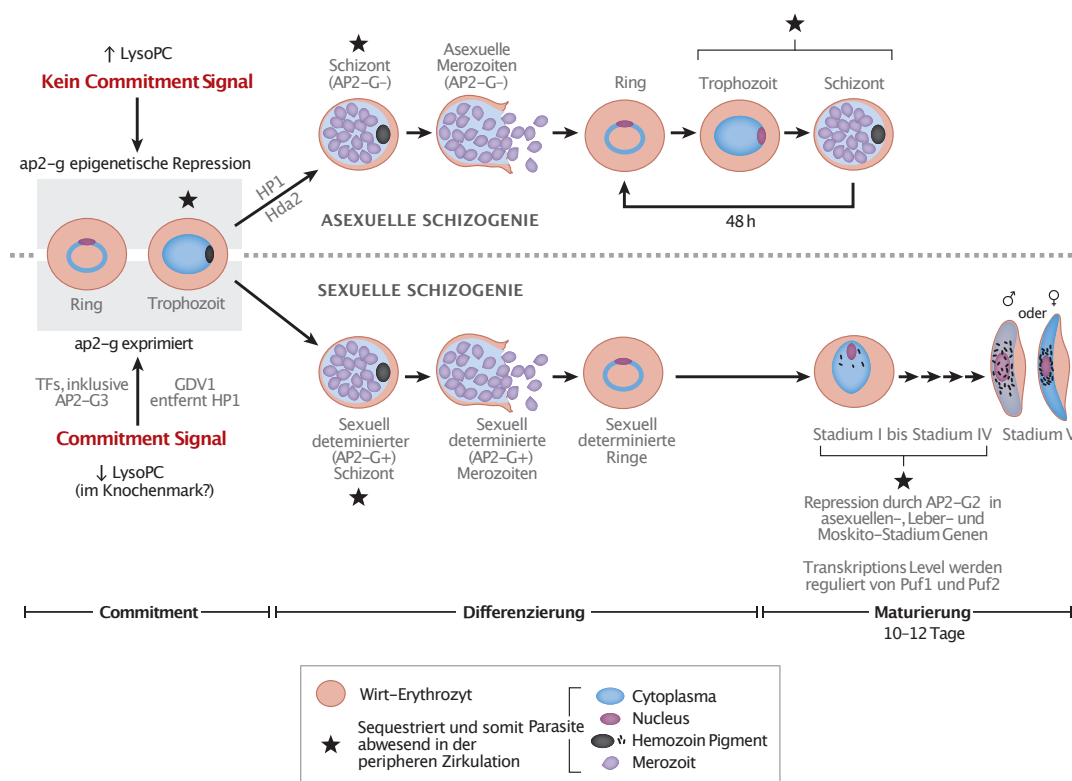


Abbildung 11 Schema zur Regulation der sexuellen Determination (Commitment) von *P. falciparum*. Durch unterschiedlich hohe LysoPC Konzentrationen in der Umgebung des Parasiten. In Anwesenheit von LysoPC wird der epigenetischer Regulation unterliegende *ap2-g* Locus nicht transkribiert, aufgrund der Bindung von HP1 und Hda2, was ein Verbleiben im asexuellen Zyklus zur Folge hat. Ist die Konzentration von LysoPC erhöht, so erhöht sich die Rate der Parasiten die in die sexuelle Entwicklung übergehen. Zu Beginn dieses Prozesses werden verschiedene

Transkriptionsfaktoren und GDV1 exprimiert. Die Expression von GDV1 löst das Ablösen von HP1 vom ap2-g Locus aus und der Parasit entwickelt sich aufgrund des ablaufenden speziellen Gametozyten-Transkriptionsprogramms zu einem sexuell determinierten Schizonten. Die sich daraus entwickelnden sexuell determinierten Merozoiten invadieren in uninfizierte Blutzellen und entwickeln sich über determinierte Ringe zu Gametozyten. (Abbildung adaptiert aus Josling et al., 2018 (141, 150))

Ein Vergleich der Transkriptome von asexuellen Parasiten und Gametozyten zeigt eine Vielzahl unterschiedlich exprimierter Gene. Zu Beginn der Gametozytogenese lässt sich die Hochregulation einer bestimmten Gruppe von Genen nachweisen, die aber in späteren Gametozyten Stadien runter reguliert sind, hierbei handelt es sich vor allem um Gene, die in Prozesse wie Glykolyse, Proteinbiosynthese und Hämoglobin Stoffwechsel involviert sind (78). Unter den Genen, die als frühe Gametozyten Marker angesehen werden, ist auch der Transkriptionsfaktor AP2-G, der zur Apicomplexa-spezifischen Apetala 2 (ApiAP2) Familie der DNA-bindenden Proteine gehört und den Hauptregulator der Gametozytogenese darstellt (152). Die Besonderheit von AP2-G ist hierbei, dass es nicht wie andere Mitglieder der ApiAP2 Familie eine bestimmte Entwicklung vorantreibt, sondern wie ein Schalter wirkt, der das Zellschicksal direkt ändert (256). In asexuellen Stadien wird *ap2-g* nicht exprimiert, da es epigenetisch durch das HP1, die Trimethylierung von H3K9 und die Histon Deacetylase 2 (Hda2) abgeschaltet ist (35, 177). In *P. falciparum* unterliegt diese epigenetische Regulation der GDV1-vermittelten Destabilisierung von Heterochromatin, was bedeutet, dass in Gegenwart von GDV1 das HP1 vom *ap2-g* Locus entfernt wird und das Gen somit exprimiert wird, der molekular hier zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt (103)(Abbildung 11). GDV1 selbst wird durch eine *long noncoding gdv1 antisense RNA* (asRNA) negativ reguliert, welche als antisense Transkript strangabwärts des Locus abgelesen wird. Ebenso ist wenig darüber bekannt in welcher Form AP2-G das Transkriptionsprogramm steuert, welche Gene außerdem dazu gehören und über die Rolle von AP2-G in späteren Phasen der Gametozytogenese. In letzter Zeit wurde AP2-G allerdings mit AP2-I in Zusammenhang mit einer Hochregulation invasions-relevanter Gene gebracht (149). Eine Assoziation von Invasions-relevanten Proteinen und AP2-G könnte im Zusammenhang mit der Auslösung von sexueller Entwicklung ein Hinweis darauf sein, dass sexuell determinierte Merozoiten alternative Invasionswege nutzen könnten.

1.2.4.1 Duffy-binding like merozoite surface protein (DBLMSP2)

Die Expression von GDV1 resultiert nicht nur in einer Hochregulation von *ap2-g* sondern auch einer Reihe verschiedener anderer Gene, die hauptsächlich durch eine HP1-vermittelte Repression während der asexuellen Replikation stumm geschaltet werden. Bei einem dieser Gene, welches allerdings auch in Abwesenheit von funktionalem AP2-G

hochreguliert wird, handelt es sich um *dblmsp2*, welches für das in späten Schizonten exprimierte Protein PF3D7_1036300 (DBLMSP2) codiert (103).

Basierend auf dem Erkennungs-Motif (NLRNA/NLRNG) der n-terminalen Region von MSP3, MSP6 und anderen multi-allelen Orthologen von MSP3-ähnlichen anderer Spezies wurde bei der Suche nach MSP3 Paralogen im Genom von *P. falciparum* ein Bereich von 32 kb auf Chromosom 10 mit acht aufeinanderfolgenden ORFs identifiziert (113, 253). Aufgrund der aufeinanderfolgenden Lokalisation auf demselben Chromosomenstrang und dem zusätzlich allen gemeinsamen n-terminalen Signalpeptid lässt sich vermuten, dass diese durch Genduplikation mit anschließend divergierender Veränderung entstanden sind. Neben dem n-terminalen Motif zeigen sechs der acht ORFs hohe Ähnlichkeiten in der c-terminalen Sequenz, die sich durch ein Glycin-reiches Motif gefolgt von einer sauren und einer Coiled-coil Region auszeichnen, daher werden diese sechs ORFs als MSP3-ähnliche Multigen Familie zusammengefasst (253). Obgleich eher untypisch für *P. falciparum* Oberflächen Antigene ließ sich bei einer Reihe von Isolaten aus verschiedenen Regionen feststellen, dass es sich bei der c-terminalen Region um eine hochkonservierte Sequenz (>95% Ähnlichkeit) handelt, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass diese Domänen wichtig für die Parasiten Biologie sind (253). Im Gegensatz dazu haben die Mitglieder dieser Familie eine hohe Diversität am N-Terminus, wobei zwei Mitglieder eine *Duffy-binding like* (DBL) Cysteine-reiche Domäne, ähnlich zu denen der Mitglieder der *var* und *ebf* Gene, wodurch eine Rolle bei der Interaktion des Parasiten mit dem Erythrozyten möglich wäre (253). Eine Bindungsaktivität gegenüber Erythrozyten konnte mit auf der Oberfläche von COS-Zellen rekombinant exprimiertem PF3D7_1035700 (DBLMSP1) nachgewiesen werden (309). Für beide Proteine, DBLMSP1 und DBLMSP2, aus Parasiten-Lysaten konnte in Erythrozyten-Bindungs-Assays eine Bindung nachgewiesen werden, welche außerdem resistent gegen die Behandlung mit Trypsin und Neuraminidase ist (134).

DBLMSP2 selbst wurde erstmals detaillierter im Zusammenhang mit einer Studie zur Identifizierung und funktionalen Charakterisierung von Resistenzgenen gegen Antimalaria Wirkstoffen beschrieben (291). Hierbei wurde der *dblmsp2* Locus zusammen mit elf anderen im Zusammenhang mit der Resistenz gegen fünf Antimalaria Wirkstoffen gefunden und eine geringere Empfindlichkeit bei Überexpression gegenüber Halofantrin, Mefloquin und Lumefantrin in *P. falciparum* Dd2 Parasiten nachgewiesen (291). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *dblmsp2* zu einer höheren Sensivität gegenüber diesen Wirkstoffen führt und eine Mutation innerhalb der SPAM-Domäne die Empfindlichkeit denselben gegenüber noch weiter verringert (292). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass in diversen Isolaten aus Kenia *dblmsp2*

starker balancierter Selektion unterliegt und die Sequenzen in dimorphen allelen Gruppen clustern (210). Im weiteren Verlauf konnte nachgewiesen werden, dass die Prävalenz von IgG in humanem Serum aus kenianischen Kohorten am höchsten gegen die polymorphen Regionen von DBLMSP2 war und mit diesen Antikörpern ein geringeres Reinfektionsrisiko mit Malaria einherging, was den Schluss zulässt, dass das Antigen DBLMSP2 wichtig für die Immunität ist, obwohl eine hohe Varianz in den beiden Hauptallelen vorhanden ist (274). Das Ergebnis einer weiteren Reinfektionsstudie mit Isolaten aus Papua Neuguinea zeigte ebenfalls, dass die Reaktion von Antikörpern gegen die SPAM-Domäne von DBLMSP1 und DBLMSP2 mit dem Schutz vor symptomatischer Erkrankung korrelieren und die Antikörper außerdem das Wachstum der Parasiten *in vitro* inhibieren und durch Opsonierung der Merozoiten die Phagozytose fördern (51). Ebenfalls konnte eine hohe Kreuzreaktivität der Epitope von DBLMSP1 und DBLMSP2 aufgrund der Ähnlichkeit der DBL-Domäne nachgewiesen werden, welches einher ging mit zuvor beschriebener Kreuzreaktivität von Antikörpern innerhalb der MSP3-ähnlichen Familie (253, 274). Die Reaktion von Immunseren, die von Patienten aus Papua Neuguinea stammten, auf die rekombinant exprimierte DBLMSP2-DBL-Domäne basierte hauptsächlich auf der Erkennung von Konformationsepitopen (134).

Bei der Untersuchung im Zusammenhang von balancierender Selektion und auftretenden Polymorphismusmustern in klinischen Isolaten aus Gambia wurde *dblmsp2* als Kandidat mit der höchsten Anzahl an *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) gefunden (8). Mittels RT-PCR der 45 Isolate wurden niedrige Transkriptionslevel von *dblmsp2* für fast alle Isolate festgestellt und gleichzeitig nachgewiesen, dass α -DBLMSP2 Antikörper nur bei einer geringen Anzahl von Schizonten binden. Bis dahin beschriebene Veränderungen der Antigene durch variable Expression von Oberflächenproteinen werden durch große subtelomere Genfamilien verursacht (55, 57, 64, 146, 241). *Dblmsp2* unterscheidet sich von diesen nicht nur durch seine Lokalisation näher am Centromer, sondern möglicherweise auch durch eine H3K9me3 Markierung, welche normalerweise mit der Repression von subtelomeren Genen assoziiert ist (177).

Die Lokalisation von DBLMSP2 macht nicht nur eine Rolle bei der veränderten Reaktion des Parasiten auf bestimmte Antimalaria Wirkstoffe und einen potentiellen Angriffspunkt für das Immunsystem, sondern auch im Zusammenhang mit der Invasion von Erythrozyten möglich. Bestärkt wird dies durch die Tatsache, dass nicht nur rekombinant exprimiertes Protein, sondern auch natives DBLMSP2 über die DBL-Domäne an Erythrozyten bindet (134). An der Invasion beteiligte Proteine in *Plasmodium* haben in der Regel eine einzelne oder eine doppelte Tandem-DBL-Domäne (2), wobei Proteine mit Single-DBL-Domäne nur in *P. knowlesi* und *P. vivax* zu finden sind. Dort binden sie in dimerisierter Form an den DARC-Rezeptor (24, 254). In *P. falciparum* haben

die EBL Liganden EBA-175, EBA-140 und EBA-181, welche an die Erythrozytenoberfläche binden, eine doppelte DBL-Domäne (121, 174, 180, 188, 251).

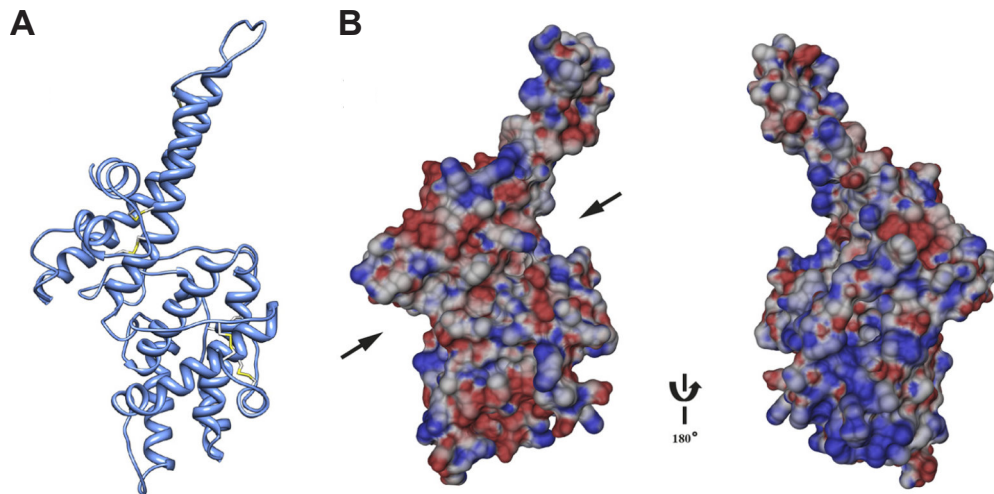


Abbildung 12 Strukturmodell der DBL-Domäne von DBLMSP2. (A) Schematische Darstellung des Bändermodells der DBL-Domäne basierend auf den Daten der Röntgenstrukturanalyse. Die Disulfid-Brücken sind gelb markiert. (B) Modell für das Elektrostatische Oberflächenpotenzial der DBL-Domäne ergänzt durch die in der Röntgenstrukturanalyse fehlenden Schleifen. Die Pfeile zeigen die Spalte, die zwischen der Subdomäne 2 und 3 entstehenden Spalte. (Abbildung aus Hodder et al., 2012 (134))

Genauere Untersuchungen zum Bindeverhalten der DBL-Domäne von DBLMSP2 zeigten, dass die Bindung durch die Anwesenheit von bestimmten Metall-Ionen (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , und Ca^{2+}) noch verstärkt werden kann und außerdem abhängig von Disulfid-Brücken innerhalb der Konformation der DBL-Domäne abhängig ist (134). Bei der Aufklärung der Struktur der DBL-Domäne wurde deutlich, dass der Boomerang-förmige α -helikale Kern aus drei Subdomänen gebildet wird, innerhalb der sich ein konservierter Bereich befindet, der eine Rolle bei der Rezeptorbindung spielen könnte (Abbildung 12). Die Struktur weist keine Transmembrandomänen auf, aber es gibt potenzielle SUB1 Spaltungsstellen nahe des N-Terminus, was einhergeht mit dem Nachweis einer prozessierten Form des Proteins. Aufgrund der SPAM-Domäne, die eine Oligomerisierung vermitteln könnte, besteht die Möglichkeit, das DBLMSP2 in einer verlängerten Form an der Oberfläche vorhanden ist und über weitere Entfernungen mit der Wirtszellmembran in Kontakt treten könnte, was für eine initiale Interaktion mit dem Erythrozyten sprechen würde (43). In weiteren Studien konnte eine Interaktion mit dem an der Invasion beteiligten MSP1-Komplex nachgewiesen werden (172).

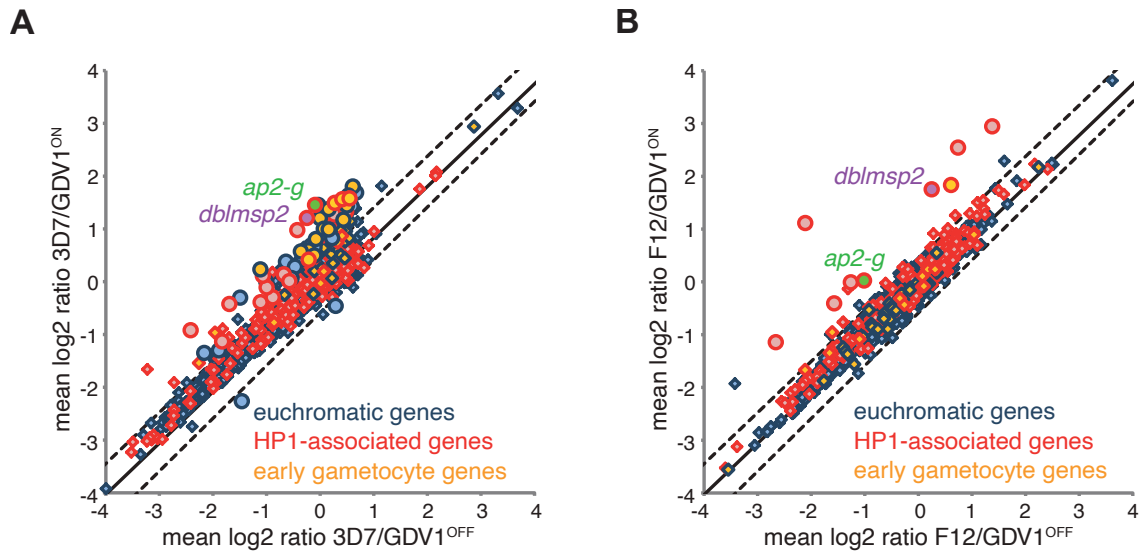


Abbildung 13 Vergleich der Expressionslevel aller Gene von asexuellen und sexuellen Parasiten.

(A) Aufgetragen sind mittleren Expressionslevel aller Gene von 3D7/GDV1^{ON} (Auslösen von Commitment durch Gabe von Shield-1) im Vergleich zu 3D7/GDV1^{OFF} Parasiten. (B) Aufgetragen sind mittleren Expressionslevel aller Gene von F12/GDV1^{ON} im Vergleich zu F12/GDV1^{OFF} Parasiten. Significant regulierte Gene sind als Kreise hervorgehoben (mittlerer Fold change (FC) Schwellenwert >1,5; q-Wert (False Discovery Rate) Schwellenwert <0,15). Bekannte frühe Gametozytenmarker sind in gelb dargestellt, als Euchromatin vorliegende Gene in blau und mit HP1 assoziierte sind rot umrandet. (Abbildung aus Filarsky et al., 2018 (103))

Einhergehend damit, dass *dblmsp2* heterochromatisch organisiert ist und nur in einer kleinen Subpopulation von Parasiten exprimiert wird, konnte eine Hochregulation von *dblmsp2* im Zusammenhang mit der Überexpression von GDV1 und des dadurch induzierten sexuellen Commitments nachgewiesen werden (103). *Dblmsp2* wurde hierbei neben einer Reihe anderer Gametozyten-spezifischer Gene einschließlich *ap2-g* gefunden (Abbildung 13 A). Die Transkription von *dblmsp2* war ebenfalls in einem Klon hochreguliert, der aufgrund einer Mutation ein funktionsloses AP2-G exprimiert und infolgedessen keine Gametozyten bildete, was eine Aktivierung von *dblmsp2* durch AP2-G ausschließt (Abbildung 13 B.) Die erhöhte Expression von DBLMSP2 bei Überexpression von GDV1 lässt aber vermuten, dass DBLMSP2 spezifisch in sexuell determinierten Schizonten exprimiert wird. Gleichzeitig wurde auf Basis dieser Daten die Hypothese aufgestellt, dass es sich um eine GDV1-abhängige Transkription handelt (103). Dies impliziert gleichzeitig eine mögliche Rolle während der sexuellen Entwicklung des Parasiten und möglicherweise bei der Invasion sexuell determinierter Ringe.

Bei der Untersuchung von klinischen Isolaten konnte für die meisten Isolate eine Expression von DBLMSP2 in etwa 1% der Schizonten nachgewiesen werden, wobei es in einer Linie 73% positive Schizonten waren (133). Die Analyse von vollständigen Transkriptomen, zeigten eine positive Korrelation mit einigen in die Gametozytogenese involvierten Genen, allerdings nicht mit *ap2-g*.

1.2.4.2 Gametocyte development protein 1 (GDV1)

Für eine lange Zeit war nicht bekannt, welche Proteine hauptsächlich den Prozess des sexuellen Commitments vorantreiben. Erste Hinweise konnten gefunden werden, nachdem Genome von dauerhaft kultivierten *P. falciparum* Linien sequenziert wurden, die ihre Fähigkeit zur Gametogenese verloren hatten. In einer der Linien konnte eine Deletion einer Region auf Chromosom 9 festgestellt werden und später dann *gdv1* (PF3D7_0935400) als das verantwortliche Gen identifiziert werden (70, 92). Es konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust eines funktionalen *gdv1*, ebenso den Verlust der Fähigkeit zur Produktion von Gametozyten zur Folge hatte, wohingegen episomal exprimiertes GDV1 diese wiederherstellte bzw. Überexpression einen Anstieg zur Folge hatte (70, 103).

Nachdem die Expression von AP2-G als erster Schritt der sexuellen Differenzierung und die Repression in asexuellen Stadien durch das Zusammenwirken von Hda2 und HP1 identifiziert wurde, wurden native HP1 Komplexe mittels Massenspektrometrie auf interagierende Proteine untersucht (35, 152). Eines der mit HP1 assoziierten Proteine ist das im Zellkern lokalisierte Protein GDV1, das ebenfalls mit HP1 im Nucleus colokalisiert und einen Komplex mit rekombinantem HP1 bildet (103). GDV1 konnte sowohl über den Anstieg der Konversions-Raten bei Überexpression als auch über in Folge der Überexpression auftretende typische Transkriptionsmuster für sexuelles Commitment und frühe Differenzierung mit der sexuellen Differenzierung in Verbindung gebracht werden (103). Mit Hilfe von *Comparative Chromatin Immunoprecipitation-sequencing* (ChIP-seq) konnte eine Assoziation von GDV1 mit Heterochromatin und im speziellen mit HP1 *in vivo* nachgewiesen werden, was den Schluss zuließ, dass GDV1 vermutlich Heterochromatin destabilisiert. Die Expression von GDV1 selbst wird über ein nichtcodierende *gdv1* asRNA reguliert, indem das Transkript als negativer Regulator wirkt (37, 103).

In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass Parasiten in deren Genom eine Mutation des *gdv1* Locus in einer Verkürzung des C-Terminus um 39 Aminosäuren resultiert, keine Gametozyten produzieren können (281). Das Protein lokalisierte noch im Kern, allerdings war das Signal schwächer und diffuser im Vergleich zum WT-Protein. Die Interaktion von HP1 und mutierten GDV1 war ebenfalls nicht beeinträchtigt, weswegen vermutet wurde, dass die Mutation zu einer verringerten Proteinstabilität führen könnte bzw. der C-terminus andere wichtige Funktionen erfüllen könnte, die trotz der Lokalisation im Kern zum Verlust der Fähigkeit zur sexuellen Konversion führen können.

Obwohl GDV1 einer der wichtigsten Faktoren im Prozess der sexuellen Entwicklung ist, ist die Funktionsweise von GDV1 bisher nicht aufgeklärt. Es ist weder bekannt in welcher

Form GDV1 mit HP1 interagiert, noch warum es spezifisch nur das HP1 am *ap2-g* Locus zu erkennen scheint. Auch gibt es keine Studien, ob GDV1 möglicherweise in weitere Prozesse involviert ist.

1.3 Ziel der Arbeit

In der Malaria-Forschung sind in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht worden, aber viele Aspekte der Biologie des Parasiten sind bisher nicht oder nur teilweise verstanden. Auch wenn der Prozess der Invasion in seinem zeitlichen Ablauf weitestgehend bekannt ist, so sind viele der Ligand-Rezeptor-Interaktionen und Funktionen der beteiligten Proteine und Komplexe weitestgehend unbekannt (61). Daher bleibt es weiterhin wichtig die beteiligten Interaktionen und Proteine zu untersuchen.

In Zusammenarbeit mit dem Swiss TPH (Basel, Schweiz) und der Griffith University (Queensland, Australien) wurde das Protein CyRPA hinsichtlich einer Lektin-Aktivität und deren Effekt auf die Invasion untersucht. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein Sialidase Motif, eine mögliche Lektin-Bindestellen und eine ASP-Box an der Oberfläche des Proteins identifiziert, allerdings konnte keine Sialidase-Aktivität bestätigt werden (101). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das gezielte Einfügen von Punktmutationen einen Effekt auf das Überleben des Parasiten *in vitro* hat und ob sich hierdurch eine weitere Funktion des Proteins zusätzlich zu der bekannten ableiten lässt.

Ein weiteres Invasion-assoziiertes Protein das DBLMSP2 sollte ebenfalls untersucht werden. Hier sollte der Zusammenhang zwischen der Expression des Proteins und der Invasion von sexuell determinierten Merozoiten untersucht werden. Das besondere Interesse an diesem Protein beruht auf der Tatsache, dass bei der Aktivierung von *ap2-g* durch GDV1-vermittelte Regulation ein abweichendes Transkriptionsprogramm gestartet wird, was in der Entwicklung zu Gametozyten resultiert. Die Assoziation von DBLMSP2 und GDV1 wirft die Frage auf, ob DBLMSP2 ebenfalls eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielt und im Besonderen bei der Invasion. Gleichzeitig wurde ein weiteres Protein der Familie zu der DBLMSP2 zählt hinsichtlich überlappender, redundanter oder synergetischer Funktion untersucht. Da vermutet wurde, dass die Expression von DBLMSP2 von GDV1 abhängig ist, wurde GDV1 ebenfalls in diese Arbeit mit einbezogen. Hier galt es zum einen die Funktionsweise des Proteins weiter aufzuklären, da bisher nicht bekannt ist, welche Eigenschaften GDV1 ermöglichen spezifisch bestimmte Gene zu regulieren und welche Rolle die Regulation von Invasions-relevanten Genen, wie *dblmsp2*, hierbei spielen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Organismen

Escherichia coli XL-10 Gold

Tet^r Δ(mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMRmrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'proAB lacI^q Z M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]

Plasmodium falciparum 3D7

MR4, Menasses/ USA, Ursprung: Afrika

2.1.1.1 Zell-Linien

Linie	Parentale Linie	Modifikation
II-3 (3D7/ <i>p230pDiCre</i>)(156)	3D7	▪ Marker frei endogen integrierte induzierbare Cre-Rekombinase im <i>p230p</i> Locus
3D7/CyRPA-recodonized-3xHA	II-3 (3D7/ <i>p230pDiCre</i>)	▪ DiCre
3D7/CyRPA-E148A-3xHA	II-3 (3D7/ <i>p230pDiCre</i>)	▪ Endogen integrierte recodierte CyRPAmut Variante mit 3xHA-Tag am 3' Ende, flankiert von zwei <i>SERA2loxP</i> -Introns
3D7/CyRPA-I149A-3xHA	II-3 (3D7/ <i>p230pDiCre</i>)	▪ Geändertes Basentriplett an einer bestimmten Position der <i>cyrpa</i> Sequenz, was Austausch einer AS zur Folge hat
3D7/CyRPA-S152A-3xHA	II-3 (3D7/ <i>p230pDiCre</i>)	
3D7/CyRPA-I155A-3xHA	II-3 (3D7/ <i>p230pDiCre</i>)	
3D7/CyRPA-G209A-3xHA	II-3 (3D7/ <i>p230pDiCre</i>)	
3D7/CyRPA-S201A-3xHA	II-3 (3D7/ <i>p230pDiCre</i>)	
3D7/CyRPA-G205A-3xHA	II-3 (3D7/ <i>p230pDiCre</i>)	

Linie	Parentale Linie	Modifikation
3D7-iGP (32)	3D7	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Unter der Kontrolle eines <i>cam</i> Promotor liegende GDV1-Expressionskassette endogen im <i>cg6</i> Locus (Marker frei) ▪ <i>gfp</i>-Tag und destabilisierende FKBP-Domäne (DD) am 3' Ende des <i>gdv1</i> im <i>cg6</i> Locus
3D7/DBLMSP2-KO	3D7	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Knockout im <i>dblmsp2</i> Locus ▪ Endogen im <i>dblmsp2</i> Locus integrierte <i>yDHODH</i>-Kassette
3D7-iGP/DBLMSP2-KO	3D7-iGP	<ul style="list-style-type: none"> ▪ GDV1-Expression induzierbar ▪ Knockout im <i>dblmsp2</i> Locus ▪ Endogen im <i>dblmsp2</i> Locus integrierte <i>yDHODH</i>-Kassette
3D7/DBLMSP2-mScarlet	3D7	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Endogenes <i>mScarlet</i>-Tag am 3' Ende des <i>dblmsp2</i> Locus
3D7-iGP/DBLMSP2-mScarlet	3D7-iGP	<ul style="list-style-type: none"> ▪ GDV1-Expression induzierbar ▪ Endogenes <i>mScarlet</i>-Tag am 3' Ende des <i>dblmsp2</i> Locus
3D7/GDV1-KO-DBLMSP2-mScarlet	3D7/DBLMSP2-mScarlet	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Knockout im <i>gdv1</i> Locus ▪ Endogen im <i>gdv1</i> Locus integriert BSD-Resistenz-Kassette ▪ Endogenes <i>mScarlet</i>-Tag am 3' Ende des <i>dblmsp2</i> Locus
3D7/DBLSMP1-KO	3D7	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Knockout im <i>dblmsp1</i> Locus ▪ Endogen im <i>dblmsp1</i> Locus integrierte <i>hDHFR</i>-Kassette
3D7-iGP/DBLMSP1-KO	3D7-iGP	<ul style="list-style-type: none"> ▪ GDV1-Expression induzierbar ▪ Knockout im <i>dblmsp1</i> Locus ▪ Endogen im <i>dblmsp1</i> Locus integrierte <i>hDHFR</i>-Kassette
3D7-iGP/DBLMSP1-KO-DBLMSP2-KO	3D7-iGP/DBLMSP2-KO	<ul style="list-style-type: none"> ▪ GDV1-Expression induzierbar ▪ Knockout im <i>dblmsp2</i> Locus ▪ Endogen im <i>dblmsp2</i> Locus integrierte <i>yDHODH</i>-Kassette ▪ Knockout im <i>dblmsp1</i> Locus ▪ Endogen im <i>dblmsp1</i> Locus integrierte <i>hDHFR</i>-Kassette
3D7-iGP/DBLMSP1-KO-DBLMSP2-mScarlet	3D7-iGP/DBLMSP2-mScarlet	<ul style="list-style-type: none"> ▪ GDV1-Expression induzierbar ▪ Endogenes <i>mScarlet</i>-Tag am 3' Ende des <i>dblmsp2</i> Locus
3D7/GDV1-KO	3D7	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Knockout im <i>gdv1</i> Locus ▪ Endogen im <i>gdv1</i> Locus integrierte BSD-Resistenz-Kassette

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller (Ort)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
6-Aminocapronsäure (EACA)	Merck (Darmstadt)
Aceton	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid/Bisacrylamid (40%)	Roth (Karlsruhe)
Agar LB (Lennox)	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
AlbumaxII	Invitrogen (Karlsruhe)
Albumin FractionV (BSA)	Biomol (Hamburg)
Ammonium Persulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Bacto™Peptone	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto™Yeast Extract	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bromphenol Blau	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth (Karlsruhe)
Choline	Sigma-Aldrich (steinheim)
Coomassie Brilliantblau R250	Merck (Darmstadt)
D-Glucose	Sigma-Aldrich
Descosept	Dr. Schuhmacher GmbH (Malsfeld)
Desoxyribonucleotide (dNTPs)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dihydroethidium (DHE)	Biomol (Hamburg)

Chemikalie	Hersteller (Ort)
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphate (Na ₂ HPO ₄)	Roth (Karlsruhe)
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (DPBS)	PAN Biotech (Aidenbach)
Essig Säure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, 70% (denatured)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, absolut	Roth (Karlsruhe)
Ethidium Bromid (EtBr)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethyleneglycol-bis(aminoethylether)tetra-essigsäure (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd Ultra Pure (methanol-free, 10%)	Polysciences Inc. (Hirschberg)
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung	Merck (Darmstadt)
Glutaraldehyd (25%)	Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure)	Roth (Karlsruhe)
HOECHST 33342	Biomol (Hamburg)
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Immersions-Öl TypF Ne23=1,5180/ve=46	Leica (Wetzlar)

Chemikalie	Hersteller (Ort)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol (MeOH)	Roth (Karlsruhe)
Milch-Pulver	Roth (Karlsruhe)
N-Acetyl-Glucosamin (GlcNaC)	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat (NaCH ₃ COO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdihydrogenphosphate (NaH ₂ PO ₄)	Roth (Karlsruhe)
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Percoll™	GE Healthcare (Freiburg)
PhosSTOP™	Roche
Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim)
RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute) Medium	Invitrogen (Waltham), Applichem (Darmstadt)
Salzsäure (HCl)	Roth (Karlsruhe)

Chemikalie	Hersteller (Ort)
Saponin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sekusept Plus	Ecolab GmbH (Monheim am Rhein)
Sorbitol	Roth (Karlsruhe)
SYBR Green I	ThermoFisher (Waltham)
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tris-Base	Roth (Karlsruhe)
Triton™ X-100	United States Biological (Salem)
Trypton	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween® 20	Roth (Karlsruhe)
VECTASHIELD Mounting Medium	Vector Laboratories

2.1.3 Kits

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Plasmid	Machery-Nagel (Düren)
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, USA
QIAamp® DNA Mini Kit	Quiagen (Hilden)

2.1.4 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Lösungen und Puffer für mikrobiologische und biochemische Methoden

Ammoniumpersulfat-Lösung	10% (w/v) APS
Cryo-Stabilat-Lösung (<i>E. coli</i>)	80% (v/v) Glycerol

CutSmart® Puffer pH 7,9	50 mM Kaliumacetat
	20 mM Tris-Acetat
	10 mM Magnesiumacetat
	100 µg/ml BSA
DNA-Ladepuffer 6x in ddH ₂ O	40 % Glycerin (v/v)
	2,5 % Xylen-Cyanol (w/v)
	2,5 % Bromphenol Blau (w/v)
FIREPol® Puffer 10x	Solis BioDyne, Estland
Gibson Assembly Master Mix (1,2 mL)	320 µL 5x Isothermaler Reaktionspuffer
	0,64 µL 10 U/µL T5 Exonuklease
	20 µL 2 U/µL Phusion DNA Polymerase
	160 µL 40 U/µL Taq DNA Ligase
	ad 1,2 mL ddH ₂ O
Isothermaler Reaktionspuffer 5x (6 mL) pH 7,5	3 mL 1 M Tris-HCl
	150 µL 2 M MgCl ₂
	60 µL each of 100 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP
	300 mL 1 M DTT
	1,5 g PEG-8000
	300 µL 100 nM NAD
	ad 6 mL ddH ₂ O
Natriumacetat-Lösung in ddH ₂ O, pH 5,2	3 M NaAc

Oligo Annealing Puffer 10x in ddH ₂ O, pH 7,5 – 8,0	100 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂
	500 nM NaCl
Phusion® HF Puffer 5x	NEB, Ipswich, USA
PBS 10x in ddH ₂ O, pH 7,4	17,8 g/L Na ₂ HPO ₄
	80 g/L NaCl
	2,4 g/L KH ₂ PO ₄
	2 g/L KCl
Sammelgel-Puffer (SDS-PAGE) in ddH ₂ O, pH 6,8	1 M Tris-HCl
SDS Ladepuffer (5x) in ddH ₂ O	416 mM SDS
	300 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	596 mM DTT
	60% Glycerol
	0,01% (w/v) Bromphenol Blau
SDS Laufpuffer in ddH ₂ O	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS
T4 DNA Ligase Reaktionspuffer in ddH ₂ O, pH 7.5	50 mM Tris-Hcl
	10 mM MgCl ₂
	1 mM ATP
	10 mM DTT

TAE-Puffer 50x
in ddH₂O, pH 8.5

2 M Tris base
1 M Acetic acid
0,05 M EDTA

TBS 10x
in ddH₂O, pH 7.4

1,5 M NaCl
30 mM KCl
250 mM Tris

TBS- Tween®
in TBS

0,02% Tween® 20

TE-Puffer (für Transfektion)
in ddH₂O, autoklaviert, pH 8.0

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

Trenngel Puffer (SDS-PAGE)
in ddH₂O

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

Tris-EDTA-Puffer (TE)
in ddH₂O

10 mM Tris-Hcl (pH 8,0)
1 mM EDTA

Western Blot Blocking-Lösung
in 1x TBS

5% (w/v) Milch-Pulver

Western Blot Transfer-Puffer
in SDS Lauf-Puffer

20% Methanol

2.1.4.2 Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Amaya™ Transfektions-Puffer in ddH ₂ O, steril filtriert	90 mM Na ₂ HPO ₄
	5 mM KCl
	50 mM HEPES
	150 mM CaCl ₂
Cytomix (für Transfektionen) in ddH ₂ O, pH 7,6 mit KOH einstellen, steril filtriert	120 mM KCl
	150 mM CaCl ₂
	2 mM EGTA
	5 mM MgCl ₂
	10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (pH 7,6)
	25 mM HEPES (pH 7,6)
DHE in DMSO	0.5 mg/mL DHE
Giemsa Färbelösung in H ₂ O (Leitungswasser)	10% (v/v) Giemsa-Lösung
Hoechst33342 in DMSO	0.45 mg/mL Hoechst33342
Human-Blut	Humanes Erythrozytenkonzentrat (steril), Blutgruppe 0 ⁺ and B ⁺ (Blutbank UKE, Hamburg)
MFS (<i>Malaria Freezing Lösung</i>) in ddH ₂ O	208 mM D-Sorbitol
	139 mM NaCl
	35% (v/v) Glycerin

MTS (<i>Malaria Thawing Lösung</i>) in ddH ₂ O	3,5 % (w/v) NaCl
Percoll® Lösung 90 %	90 % (v/v) Percoll 10 % (v/v) 10x PBS
Percoll® 60 %	67% (v/v) 90% Percoll solution 33% (v/v) RPMI-Komplettmedium 8% (w/v) Sorbitol
RIPA Lyse-Puffer in ddH ₂ O	1% (v/v) IGEPAL CA-630 0,25% (w/v) DOC 10% (v/v) Glycerol 2 mM EDTA 137 mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1x Protease Inhibitor
Saponin-Lösung in ddH ₂ O, steril filtriert	0,03%- 0,15% (w/v) Saponin
Sorbitol-Lösung in ddH ₂ O, steril filtriert	5% (w/v) D-Sorbitol
TB-Puffer (Transfektionspuffer) pH 7,3	90 mM Na ₂ HPO ₄ 5 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 50 mM HEPES

2.1.5 Antibiotika und andere Zusätze

	Stamm-Lösung	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/mL in 70 % EtOH	100 µg/mL	Roche , Mannheim
BSD	5 mg/mL in RPMI	10 µg/mL	Invitrogen, Karlsruhe
Compound 2	10 mM in RPMI	1:10.000	Michael Blackman, Francis Crick Institute, London, GB
DSM1	187,5 mM in DMSO	20 µL in 1 mL 95 % DMSO/5 % PBS	BEI Resources
Gentamycin	80 mg/2 mL SF Lösung	0,2 mg/mL	Ratiopharm, Ulm
Neomycin	50 mg/mL in RPMI	2 mg/mL	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rapalog	500 mM in EtOH	250 nm in RPMI	Clontech, USA
Shield-1	10mM in EtOH	0,675 µM	Cayman Chemical, USA
WR99210	20 mM in DMSO	1:1000 in RPMI	Jacobus Pharmaceuticals, USA

2.1.6 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper	Organismus	Verdünnung		Hersteller/Ursprung
		WB	IFA	
α -BiP	Kaninchen	1:2000		Struck <i>et al.</i> (265)
α -CyRPA	Mause		100 mg/mL	Dreyer <i>et al.</i> (82)
α -GFP	Mause	1:1000	1:500	Roche (Mannheim)
α -GFP	Kaninchen	1:1000	1:500	ChromoTek (Planegg)
α -HA	Ratte	1:500	1:200	Roche (Mannheim)

Antikörper	Organismus	Verdünnung		Hersteller/Ursprung
		WB	IFA	
α -HP1	Kaninchen		1:500	Brancucci <i>et al.</i> (35)
α -Pfs16	Mause		1:1000	Alano (6)
α -mouse 680RD	Ziege	1:10000		LI-COR (Lincoln)
α -mouse 800CW	Ziege	1:10000		LI-COR (Lincoln)
α -mouse Alexa488	Ziege		1:2000	Invitrogen (Karlsruhe)
α -mouse Alexa594	Ziege		1:2000	Invitrogen (Karlsruhe)
α -rabbit 680RD	Ziege	1:10000		LI-COR (Lincoln)
α -rabbit 800CW	Ziege	1:10000		LI-COR (Lincoln)
α -rabbit Alexa488	Ziege		1:2000	Invitrogen (Karlsruhe)
α -rabbit Alexa594	Ziege		1:2000	Invitrogen (Karlsruhe)
α -rat 680RD	Ziege	1:10000		LI-COR (Lincoln)
α -rat 800CW	Ziege	1:10000		LI-COR (Lincoln)
α -rat Alexa488	Ziege		1:2000	Invitrogen (Karlsruhe)
α -rat Alexa594	Ziege		1:2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Streptavidin Alexa488			1:2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Streptavidin Alexa594			1:2000	Invitrogen (Karlsruhe)

Glycan-biotin Konjugate (GlycoNZ (Auckland, Neuseeland))

Name	Konjugat	Konzentration
0997-BP	Neu5Ac- α -(2,6)-Gal- β -(1,4)-GlcNAc- β -C3-PAA-biot	10- 30 mg/mL
0957-BP	Neu5Gc- α -(2,6)-Gal- β -(1,4)-GlcNAc- β -C3-PAA-biot	10- 30 mg/mL

Fluoreszenzfarbstoffe

	Stamm-Lösung	Endkonzentration	Hersteller
HOECHST33342	0,45 mg/mL	0,45 ml/mL	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.7 Enzyme

Enzym	Hersteller
AgeI-HF (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
AvRII (5 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
BamHI-HF (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
BsaI-HF (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
CIP (5 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
EcoRV-HF (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
FIREPol DNA Polymerase [10 U/ μ L]	NEB, Ipswich, USA
HindIII-HF (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
Kapa Taq HotStart [®] DNA Polymerase (5 U/ μ L)	Roche, Basel, Schweiz
NdeI (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
NotI-HF (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase [2 U/ μ L]	NEB, Ipswich, USA
SacI-HF (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
T4 DNA Ligase (400 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
XbaI (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA
XhoI (20 U/ μ L)	NEB, Ipswich, USA

2.1.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden als 100 mM Stammlösung von Sigma-Aldrich bezogen. Für die spätere Verwendung als Primer wurden sie in H₂O auf eine Endkonzentration von 10 mM verdünnt. Für das Annealing der Oligonukleotide für gRNA wurden die Stammlösungen verwendet.

Tabelle 1 Oligonukleotide für Klonierungen von CRISPR-Plasmiden

Material und Methoden

No.	Name	Sequenz	T _M
P16	<i>Gibson_GDV1_Ala(389+400)_rev</i>	ATTTGTTACTAATATAATATGAGCGACTC GTTCATTC	59
P17	<i>Gibson_GDV1_Ala(408+410)_for</i>	CATATTATATTAGTAACAAATGCTTCCGC TGTAATATCTT	59
P18	<i>Gibson_GDV1_Asn(389+400)_rev</i>	ATTTGTTACTAATATAATATGATTGACTC GTTCATTC	56
P19	<i>Gibson_GDV1_Asn(408+410)_for</i>	CATATTATATTAGTAACAAATAATTCCAA TGTAATATCTTATAGTTATC	56
P20	<i>Gibson_GDV1_Asp/Ala_Fra1_rev</i>	ATTTGTTACTAATATAATATGATCGACTC GTTCATTC	58
P21	<i>Gibson_GDV1_Asp/Asn_Fra2_for</i>	CATATTATATTAGTAACAAATGATTCCGA TGTAATATCTT	57
P24	<i>Gibson_GDV1_1-381_Fra1_rev</i>	CAATAAATGATTGTATTAGAAAATTCATT ATGATTAAATAAAC	55
P25	<i>Gibson_GDV1_381-420_Fra2_for</i>	CATAATGAATTTTCTAATACAATCATTTA TTGTATTAAAG	55
P26	<i>Gibson_GDV1_KO_Fra1_rev</i>	AAATATATTTTAATTTTTCATATCGTTC GTATTAAGATAAAACAAACCT	60
P27	<i>Gibson_GDV1_KO_Fra2_for</i>	TAATACGAACGATAGTGAAAAATTAAAT ATATTTATATAATATTATTTTATTTTATT ATA	56
P28	<i>Gibson_GDV1_KO_Fra2_rev</i>	TGCCTACACAACCTCATTCGTTCTTATATA TAATGAG	60
P29	<i>Gibson_GDV1_KO_Fra3_for</i>	TCATTATATATAAGAACGAATGAGTTGTG TAGGCAT	60
P31	<i>Gibson_GDV1_KO_Fra1_for</i>	GCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGCT TGTCGACGTACCTCGTCTA	74
P32	<i>Gibson_GDV1_KO_Fra3_rev</i>	ATCGGACTTTTCTTCTTCAGGGTAGCTGA TATCGGATCCGAATTCGACGATTAGGAC	71
P33	<i>Gibson_NotI_GDV1 3'_rev</i>	CAACTCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTA CTCATGCGGCCGCATTTATATGTAC	69
P34	<i>Gibson_BamHI_GDV1_5'_for</i>	TATATTTTATAATAATAAATACCTAATAG AAATATATCAGGATCCTTAATATGAACTA CAAAAAAGAGACTTGCG	62 ° C
P37	<i>Gibson_DBLMSP1_KO_Fra1_for</i>	GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGC GAGGAAGCGGAAGCTTGCTAAATCTCATA AAACTGTTTGTATAAAGTAATG	74 ° C
P38	<i>Gibson_DBLMSP1_KO_Fra1_rev</i>	GTTTCTGCCTTTTCTTGTGCAATTTGAT ATTTTTTATATATATATGAAGATTCAAAA TAAATAAAGAAAAG	63 ° C

No.	Name	Sequenz	T _M
P45	<i>Gibson_DBLMSP1_KO_Fra3_for</i>	GAACATATTTATTAAACGATACTGAAGAT ACGGAAGATATAGAAGAGGAAAATAAGGA AAAAGAACTCAGTAATC	65 ° C
P46	<i>Gibson_DBLMSP1_KO_Fra3_rev</i>	AACATCATCGGACTTTTCTTCTTCAGGGT AGCTGATATCGGATCCGTAATGTTAATTC TTAAAATTTTGAACATTTCTCTATTAAT	69 ° C
P47	<i>Gibson_GDV1_Ala(389+400)_new_rev</i>	ATTTGTTACTAATATAATATGAGCGACTC GTTTCATTCATATATAAATCATTTACAGCT TGTATAAAAGGATTAG	64 ° C
P48	<i>Gibson_GDV1_Asn(389+400)_new_rev</i>	ATTTGTTACTAATATAATATGATTGACTC GTTTCATTCATATATAAATCATTTACATTT TGTATAAAAGGATTAG	64 ° C
P49	<i>Gibson_DBLMSP1_KO_Fra2_for_new</i>	TATATAAAAAATATCAAATGCACAAGAGA AAAGGCAGAAACAAAATAAATTATAATAA AAAAC	61 ° C
P50	<i>Gibson_DBLMSP1_KO_Fra2_rev_new</i>	CTTCCGTATCTTCAGTATCGTTTAATAAA TATGTTCTTATATATAATGAGAAATAAAT ATTTAAC	60 ° C
P64	<i>Gibson_GDV1_KO_BSD_Fra1_for</i>	GGAAGCGGAAGCTTGTCGACGTACCTCGT CTATTTG	68 ° C
P65	<i>Gibson_GDV1_KO_BSD_Fra1_rev</i>	AAGAGAAAAGGCAGAAACAAAATAAATTA TAATAAAAAAC	63 ° C
P68	<i>Gibson_GDV1_Fra2_BSD_for</i>	GAACGATAGTGACAAGAGAAAAGGCAGAA AC	61 ° C
P69	<i>Gibson_GDV1_Fra2_BSD_rev</i>	CAACTCATTCTTTAATAAATATGTTCTTA TATATAATGAGAAATAAATATTTAACATA TG	58 ° C

Tabelle 2 Oligonukleotide für CRISPR-gRNAs

No.	Name	Sequenz
	<i>CyRPA_gRNA_1_F</i>	TATTAGACAAAAGGGGTTACTGCAAGG
	<i>CyRPA_gRNA_1_R</i>	AAACCCTTGCGAGTAACCCCTTTTGTCT
	<i>CyRPA_gRNA_2_F</i>	TATTAACATATGAGTAGACAAAAGGGG
	<i>CyRPA_gRNA_2_R</i>	AAACCCCTTTTGTCTACTCATAGTTA
	<i>CyRPA_gRNA_3_F</i>	TATTGAAGAAAACCTTGTATATATACCC
	<i>CyRPA_gRNA_3_R</i>	AAACCTTCTTTTGAACATATATATGGG

No.	Name	Sequenz
	<i>CyRPA_gRNA_4_F</i>	TATTCCATATATATGTTCAAAAGAAGG
	<i>CyRPA_gRNA_4_R</i>	AAACGGTATATATACAAGTTTCTTCC
GC1	<i>CyRPA_gRNA_5_F</i>	TATTAAAAGAAGGTAAAAGATTCT
GC2	<i>CyRPA_gRNA_5_R</i>	AAACAGAATCTTTTACCTTCTTTT
GG3	<i>GDV1_KO_guide_for</i>	TATTTGATGCTGGTTGTGAGGACT
GG4	<i>GDV1_KO_guide_rev</i>	AAACAGTCCTCACAACCAGCATCA
GD5	<i>DBLMSP1_KO_gRNA1_for</i>	TATTAAATGGGGATTGGATTAGTG
GD6	<i>DBLMSP1_KO_gRNA1_rev</i>	AAACCACTAATCCAATCCCCATTT
GD7	<i>DBLMSP1_KO_gRNA2_for</i>	TATTAGAACAACAAGAAGACATCG
GD8	<i>DBLMSP1_KO_gRNA2_rev</i>	AAACCGATGTCTTCTTGTGTTCT
GD9	<i>DBLMSP2_KO_guide_for</i>	TATTGATGGTAGTGAATTAGCTGG
GD10	<i>DBLMSP2_KO_guide_rev</i>	AAACCCAGCTAATTCACCTACCATC
GD11	<i>DBLMSP2_mScarlet_guide_for</i>	TATTATCTTTTGATAAACTATTCA
GD12	<i>DBLMSP2_mScarlet_guide_rev</i>	AAACTGAATAGTTTATCAAAAGAT

Tabelle 3 Oligonukleotide für Integrations-PCR

No.	Name	Sequenz	T _M
C1	<i>CyRPA_rec-IntCheck-P1F</i>	GGTTATCTTATATATTGTAAAAAATTATA TGATTAACC	53° C
C2	<i>CyRPA_rec-IntCheck-P2R</i>	CATATATAATAACTTCGTATAATGTATGC TATACG	54° C
C3	<i>5edit_for</i>	CGCTAATTATGAGTATTACCCGTAC	54° C
C4	<i>CyRPA_rec-IntCheck-P4R</i>	GATTCATCTCAAGAATTATCACTTGC	54° C

Material und Methoden

No.	Name	Sequenz	T _M
C5	<i>CyRPA_rec-IntCheck-P2.2R</i>	CCTGTTAAATCAGTTTCTTTAAACAAATC	53° C
C6	<i>CyRPA_rec-IntCheck-P2.3R</i>	TATGTGGTCTACCAGTTAAATCTG	54° C
D1	<i>DBLMSP2_KO-IntCheck-P1F</i>	GCACTATTTTAATAGAGTCTAACATAATT AC	53° C
D2	<i>KO-IntCheck-cam5-P2R</i>	GAAATAGATATTTTTATAATAAACCAATA GATAAAATTTGTAGAG	55° C
D3	<i>KO-IntCheck-hrp2-P3F</i>	CCTAATCATGTAAATCTTAAATTTTTCTT TTTAAAC	55° C
D4	<i>DBLMSP2-Intcheck-P4R</i>	GGACATATCGAATTATTAATAATGTCATG TAATG	55° C
D6	<i>DBLMSP2_mScarlet-IntCheck-P1F</i>	CTAAAACTATAGATCCTTCTAAGATTGAC G	55° C
D5	<i>DBLMSP2-wt-InteCheck-R</i>	GTCTTTACAAATCTCTTCAGTAGG	52° C
D7	<i>mScarlet-int-seq-R</i>	CCCTTAAGCACACCATCC	56° C
D8	<i>mScarlet-int-seq-F</i>	GTGACACAGGATACAAGTCTTG	55° C
D9	<i>KO-IntCheck-yDHODH-P3.2F</i>	GCTAAGGGTTATACATCCATAGATC	54° C
G1	<i>GDV1-5'Tag-InteCheck-F1</i>	GAAAAGCATTCTCATTTTTTAATT	52° C
G2	<i>GDV1_intecheck_rev</i>	GTGTATTTTCATTAAATATTAAATCAGCAT TC	53° C
G3	<i>gdv1HA_F</i>	CACAGCTTTTCGAATTACACAACAT	56° C
10	<i>yDHODH-int-seq-R</i>	CCACATCAATGAAAAGACCATTTC	56° C
P57	<i>HRPII 3'_FOR</i>	TCCTTATAAATATAGAATAATGAATCATA TAAACAT	53° C
P58	<i>GDV1-KO_REV</i>	CATCTTATATATGTGTACCAAGTCC	54° C
P59	<i>Intecheck_3'DBLMSP1_rev</i>	CTAAACAACAACATATATATATATATACA TG	50° C

No.	Name	Sequenz	T _M
P60	<i>Intecheck_hrpII 3'WR cassette_for</i>	CCTTATAAATATAGAATAATGAATCATAT AAAAC	51° C
P61	<i>Intecheck_cam 5' WR cassette_rev</i>	GCGAGCTAATTAATAAATATCCTTATTTG	54° C
P62	<i>Intecheck_5' DBLMSP1_for</i>	GCACACAGAATTTAAATCATGATGTG	57° C
P63	<i>Intecheck_WT locus DBLMSP1_rev</i>	GAAC TTTCTTTAACAGCCACACTAATCC	58° C

2.1.9 Vektoren und Plasmide

Plasmid	
pH-gC (103)	AmpR; ori; Cas9-Expressions-Kassette inkl. Nucleus-Zielsequenz; Expressions-Kassette für gRNA inkl. Scaffold-Sequenz und AvrII Schnittstelle; Resistenz-vermittelnde Expressions-Kassette (<i>cam</i> -Promotor, <i>hDHFR</i> , <i>hrp2</i> -Promotor) eingebettet zwischen 2 MCSs zum Einfügen homologer Regionen
pY-gC (132)	AmpR; ori; Cas9-Expressions-Kassette inkl. Nucleus-Zielsequenz; Expressions-Kassette für gRNA inkl. Scaffold-Sequenz und AvrII Schnittstelle; Resistenz-vermittelnde Expressions-Kassette (<i>cam</i> -Promotor, <i>yDHODH</i> , <i>hrp2</i> -Promotor) eingebettet zwischen 2 MCSs zum Einfügen homologer Regionen
pB-gC (103)	AmpR; ori; Cas9-Expressions-Kassette inkl. Nucleus-Zielsequenz; Expressions-Kassette für gRNA inkl. Scaffold-Sequenz und AvrII Schnittstelle; Resistenz-vermittelnde Expressions-Kassette (<i>cam</i> -Promotor, <i>bsd</i> , <i>hrp2</i> -Promotor) eingebettet zwischen 2 MCSs zum Einfügen homologer Regionen
pCRISPR-Cas_KO_only	AmpR; ori; Cas9-Expressions-Kassette inkl. Nucleus-Zielsequenz; Expressions-Kassette für gRNA inkl. Scaffold-Sequenz und AvrII Schnittstelle; MCS zum Einfügen von homologen Regionen und Resistenz-Kassette

Material und Methoden

pD_CyRPA_loxPint_1_NB	AmpR; ori ; <i>SERA2loxP</i> -Intron; flankierende homologe Regionen für Ziel-Locus	
pD_CyRPA_loxPint_2_Fr1		
pD_CyRPA_loxPint_2_Fr2		
pD_CyRPA_loxPint_2_Fr3	AmpR; ori; <i>SERA2loxP</i> -Intron; flankierende homologe Regionen; recodierte Teilsequenz des <i>cyrpa</i> ; 3xHA-Tag; verändertes Basentriplett zum Austausch einer AS an definierter Position: Fr2 (E(148)); Fr3 (I(149)); Fr4 (S(152)); Fr5 (I(155)); Fr6 (S(201)); Fr7 (G(205)); Fr8 (G(209))	
pD_CyRPA_loxPint_2_Fr4		
pD_CyRPA_loxPint_2_Fr5		
pD_CyRPA_loxPint_2_Fr6		
pD_CyRPA_loxPint_2_Fr7		
pD_CyRPA_loxPint_2_Fr8		
pD_DBLMSP2_mScarlet	AmpR; ori; homologe Regionen strangauf- und strangabwärts des 3'Ende von <i>dblmsp2</i> ; <i>mScarlet</i> in Frame mit <i>dblmsp2</i>	
Plasmid	Mutter-Plasmid	Modifikation
pY_gC_CyRPA_g1	pY-gC	AmpR; ori; Cas9-Expressions-Kassette inkl. Nucleus-Zielsequenz; Expressions-Kassette für gRNA inkl. der gewählten Guide-Sequenz; Resistenzvermittelnde Expressions-Kassette (pY: <i>yDHODH</i> ; pH: <i>hDHFR</i>)
pY_gC_CyRPA_g2	pY-gC	
pH_gC_CyRPA_g3	pH-gC	
pH_gC_CyRPA_g4	pH-gC	
pH_gC_CyRPA_g5	pH-gC	
pY_gC_DBLMSP2_mScarlet_gR1	pY-gC	
pY_CC_DBLMSP2_KO_gR1	pCRISPR-Cas_KO_only	<i>yDHODH</i> -Expressions-Kassette in homologe Regionen für Chr. 10 (1.432.042-591 und 1.434.716-435.296); DBLMSP2-KO gRNA 1
pH_CC_DBLMSP1_KO_g1	pCRISPR-Cas_KO_only	<i>hDHFR</i> -Expressions-Kassette in homologe

Material und Methoden

pH_CC_DBLMSP1_KO_g2	pCRISPR-Cas_KO_only	Regionen für Chr. 10 (1.412.279-413.274 und 1.415.029-531); DBLMSP1-KO gRNA 1 bzw. 2
pY_CC_GDV1_KO_g1	pCRISPR-Cas_KO_only	<i>yDHODH</i> -Expressions-Kassette in homologe Regionen für Chr. 9 (1.376.716-377.952 und 1.378.156-610); GDV1-KO gRNA 1
pB_CC_GDV1_KO_g1	pCRISPR-Cas_KO_only	<i>bsd</i> -Expressions-Kassette in homologe Regionen für Chr. 9 (1.376.716-377.952 und 1.378.156-610); GDV1-KO gRNA 1
Überexpressions-Plasmide		
pHcamGDV1_GFP_DD (103)	pHcamGFP (312)	FKBP-destabilisierende Domäne fusioniert am 3' des <i>gfp</i> ; <i>gdv1</i> am 5' des <i>gfp</i>
pHcamGDV1_384-421_mut_GFP_DD	Modifiziertes pHcamGDV1_GFP_DD Plasmid, entweder Deletion von mehreren Basentriplets oder Austausch eines Basentriplets	
pHcamGDV1_Ala_mut_GFP_DD		
pHcamGDV1_Asp/Ala_mut_GFP_DD		
pHcamGDV1_Asp/Asn_mut_GFP_DD		

2.1.10 Kulturmedien

Lysogeny Broth (LB, Lennox)
in ddH₂O, autoklaviert

1% (w/v) Hefe Extrakt

0,5% (w/v) NaCl

1% (w/v) Trypton

RPMT-Komplettmedium steril filtriert, pH 7,2	10,44 g/L RPMI-1640 (+L-Glutamin/ -NaHCO ₃)
	0,1 mM Hypoxanthin
	25 mM HEPES
	0,5 % (w/v) Albumax II
	24 mM NaHCO ₃
	0,4 mM Gentamycin

2.1.11 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelkammer PeqLab PerfectBlue	PeqLab/VWR (Radnor)
Analysewaage ATILON	Satorius (Göttingen)
Analysewaage KERN 572	KERN & SOHN GmbH (Balingen- Frommern)
ChemiDoc™XRS+ Molecular Imager®	BIO-RAD (München)
CO2 Inkubator CO 150	Eppendorf (Hamburg)
CryoCube FC660h	Eppendorf (Hamburg)
Durchflusszytometer Novocyte 1000	ACEA Bioscience (USA)
Eismaschine EF 156 easy fit	Scotsman® (Vernon Hills, USA)
Elektrophorese Netzteil E835	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Elektrophorese Netzteil EV231	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Elektroporator Nucleofector®II	Lonza (Köln)
Inkubator HERA THERM	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Magnetischer Rührer RSM-01HS	Phoenix Instruments (Garbsen)
Modulare Inkubations-Kammer MIC-101	Embrient Inc (San Diego, USA)
Microwelle micromaxx® MM41568	Medion (Mülheim)

Gerät	Hersteller
Netzteil Power Pac™ Basic	BIO-RAD (München)
Netzteil Pac™ HC High Current Supply	BIO-RAD (München)
PCR Cycler ThermalCycler C1000 Touch™	BIO-RAD (München)
PCR Cycler Thermal Cycler GeneTouch	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
pH-Meter 766 Calimatic	Knick International (Berlin)
Pipetten Pipetman L P2L/P20L/P200L/P1000L	Gilson (middleton)
Pipettierhilfe PIPETBOY acu 2	VWR International GmbH (Hannover)
Roll-Mixer Sun Lab SU1400	Sunlab (Aschaffenburg)
SDS-Gelelektrophorese Mini-PROTEAN Tetra Cell System	BIO-RAD (München)
Schüttelinkubator Innova®40	Eppendorf (Hamburg)
Schüttelinkubator Max Q 4000	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Spectrometer DS-11+Spectrophotometer	DeNovix (Wilmington)
Sterilbank Maxisafe 2020	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Thermoblock Thermomixer F1.5	Eppendorf (Hamburg)
Ultrapur Wasseraufbereitungs-System Mili-Q Q-Pod CDUFB1001	Merck (Darmsatdt)
Vakuum Pumpe (Cell culture) Vacusafe	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal)
Vortexer VV3	VWR (Radnor)
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Western Blot Dokumentation Odyssey FC Imaging System	LI-COR (Lincoln)
Zentrifuge	Hersteller

Material und Methoden

5412 D Centrifuge (F45-24-11)	Eppendorf (Hamburg)
5424 Centrifuge (FA-45-24-11)	Eppendorf (Hamburg)
5810 R Centrifuge (A-4-62)	Eppendorf (Hamburg)

Mikroskope	Kamera	Hersteller
DM2000 LED	DMC2900 (Leica)	Leica (Wetzlar)
DM6 B (upright widefield)	DFC9000GT (Leica)	Leica (Wetzlar)
DMi8 (inverse live cell widefield)		Leica (Wetzlar)

Material	Hersteller
Amersham™ Protran™ Nitrocellulose Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Chirurgische Einmal-Skalpelle	Braun (Aschaffenburg)
Dako Stift	Dako (Hamburg)
Deckgläser 24 x 65 mm	R. Langenbrick Labortechnik (Emmendingen)
Einmal-Injektions-Kanülen Gr.20 (0,4 x 20 mm)	Braun (Aschaffenburg)
Immersions oil	Merck (Darmstadt)
Gene Pulser® Elektroporationsküvetten	BIO-RAD (München)
Glasperlen	Roth (Karlsruhe)
Injekt® Injektionsspritzen 2 mL und 20 mL	Braun (Aschaffenburg)
Leucosilk	BSN medical GmbH (Hamburg)
Objektträger 76 x 26 mm	Engelbrecht Labortechnik (Edermünde)
Parafilm® M 4 in. x 125 ft	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)

Material	Hersteller
SDS-PAGE und Westernblot Kammer + Zubehör	BIO-RAD (München)
Spectra/Por® Dialyseschlauch MWCO 6000-8000	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Sterilfilter 0,2 µm	Sarstedt (Nümbrecht)
Whatman™ Papier	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)

Plastiklaborbedarf wurde von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.1.12 Datenbanken, Software und Onlinetools

AFDB Cluster (23)	https://cluster.foldseek.com/
Affinity Designer 1.10.8	https://affinity.serif.com/de/designer/
AlphaFold (151)	https://alphafold.ebi.ac.uk/
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
CATH/Gene 3D (170, 249)	https://www.cathdb.info/
ChimeraX 1.7	https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/
CHOPCHOP (160, 161, 199)	https://chopchop.cbu.uib.no/
ColabFold (196)	https://github.com/sokrypton/ColabFold
FoldSeek (23, 290)	https://search.foldseek.com/search
HHPred	https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred
Image J Fiji 2.1.0/1.53c (31, 242)	https://fiji.sc/
GraphPad Prism 10 for macOS	GraphPad Software, LLC
Image Lab™ 5.2	BIO-RAD
InterPro	https://www.ebi.ac.uk/interpro/
iTasser (320-322)	https://zhanggroup.org/I-TASSER/

Leica Application Suite X	Leica
Leica Application Suite 4.7	Leica
LI-COR Image Studio	LI-COR
Microsoft Office 365 for Mac	Microsoft
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NovoExpress 1.2.5	ACEA Biosciences
Parasitemia 1.0.1.1 (44)	http://www.gburri.org/parasitemia/
PlasmoDB	https://plasmodb.org/plasmo/
RCSB Proteindatenbank	https://www.rcsb.org/
SnapGene 5.1.7	https://www.snapgene.com
UniProt Protein Datenbank (56)	https://www.uniprot.org/

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Sterilisation von Lösungen und Materialien

Die verwendeten Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden vor ihrer Verwendung durch Dampfdrucksterilisation (121°C, 20 Minuten, 1 bar Druck) autoklaviert. Nicht hitzebeständige Substanzen wurden durch Filtration über eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

2.2.1.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Für die Anzucht von Bakterien wurden die Zellen mit einer sterilen Pipettenspitze von einer LB-Agarplatte entnommen und in flüssiges LB-Medium überführt. Falls notwendig, wurde ein selektives Antibiotikum zugegeben und im Anschluss schüttelnd über Nacht (ÜN) bei 37°C inkubiert.

Die kurzfristige Lagerung von Bakterienstämmen erfolgte auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum. Die Zellen wurden mit einer sterilen Pipettenspitze beimpft und bei 37°C ÜN inkubiert. Anschließend wurden die Agarplatten bei 4°C gelagert.

Für die Langzeitlagerung wurden 500 µL einer ÜN E. coli Kultur in 500 µL Glycerin (v/v 80%) in einem Kryoröhrchen resuspendiert und bei -70 °C gelagert.

2.2.1.3 Herstellung von chemisch kompetenten E. coli

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte basierend auf dem von Inoue, Nojima und Okayama (142) publizierten Verfahren, welches zu einer verringerten Stabilität der bakteriellen Zellmembranen führt und damit zu einer erhöhten Aufnahme von Plasmiden. Zu Beginn wurden 10 mL Chloramphenicol (34 µg/mL) enthaltendes LB-Medium mit einem Glycerol-Stabilat von E. coli XL10 Gold-Zellen beimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler ÜN kultiviert. Am nächsten Tag wurden 5 mL der Kultur in 200 mL SOB-Medium (Zusatz von 10 mM MgCl₂) überführt und bei 18 °C und 160 U/min schüttelnd inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,45-0,6 erreicht wurde. Zur Ernte der Bakterien wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3000 xg für 15 Minuten bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen in 20 mL eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert und anschließend in 16 mL eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden unter ständigem Mischen langsam 1,2 mL DMSO zugegeben. Die kompetenten Zellen wurden in 100 µL Aliquots bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.4 Hitzeschocktransformation von kompetenten E. coli-Zellen

Für eine Hitzeschocktransformation wurden kompetente E. coli XL10 Gold-Zellen (100 µL) auf Eis aufgetaut, bevor die rekombinante Plasmid-DNA hinzugefügt wurde. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden die Bakterien 10 Minuten lang auf Eis inkubiert, damit die DNA an die Zellmembranen adsorbieren konnte. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C für 45 Sekunden durchgeführt, gefolgt von einer weiteren Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, die Suspension 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert (schüttelnd bei 750 U/min) und danach mit Hilfe steriler Glaskügelchen auf Ampicillin (100 µg/mL) enthaltende LB-Agar-Platten ausplattiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente von einem DNA-Template. Für die Vervielfältigung eines DNA-Fragments mit anschließender Klonierung (präparative PCR) wurde eine Phusion-Polymerase oder eine KAPA-Polymerase verwendet, wobei es sich bei beiden um High-Fidelity-Hot-Start-Enzyme mit Korrekturlesefunktion handelt, während für Kolonie-Screens und Integrationsprüfungen (analytische PCR) eine FIRE-Polymerase eingesetzt wurde. Die

eingesetzten 5'- und 3'-Region flankierenden spezifischen Oligonukleotide (Primerpaare, vorwärts und rückwärts) wurden aus einer 100 µM Stammlösung eingesetzt und vorher entsprechend verdünnt. Die Primer wurden anhand der bei PlasmODB (www.plasmodb.org) bereitgestellten Sequenzen und der SnapGene-Software (Version 5.1.7) generiert.

Die notwendigen Einstellungen für eine PCR hängen von der Art der verwendeten Primer, der Länge der amplifizierten Sequenz und der DNA-Polymerase ab, so dass für jede PCR ein eigenes Programm erstellt wurde. Ein allgemeines Schema sowie die verwendeten Komponenten sind in der untenstehenden Tabelle aufgelistet.

Präparative PCR		Analytische PCR	
5x HF-Puffer	5 µL	10x FIRE-Polymerase-Puffer	1 µL
dNTPs	2,5 µL	MgCl ₂ (25 mM)	0,8 µL
Primer fw (10 µM)	1 µL	dNTP's	1 µL
Primer rev (10 µM)	1 µL	Primer fw (10 µM)	0,4 µL
Phusion DNA-Polymerase	0,25 µL	Primer rev (10 µM)	0,4 µL
Template-DNA (1 ng/µL)	1 µL	FIRE-DNA-Polymerase	0,16 µL
H ₂ O _{bidest}	ad 25 µL	Template-DNA (10 ng)	1 µL
		H ₂ O _{bidest}	ad 10 µL

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:sek]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2:00	1
Denaturierung	95	0:30	
Annealing	x	0:30	30 - 35
Elongation	64	y	
Finale Elongation	64	5:00	1

2.2.2.2 Agarose Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend aufgetrennt dargestellt werden. Die Moleküle wandern bedingt durch die negative Ladung der enthaltenen Phosphatgruppen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes von der Kathode zur Anode. Die Poren der Agarose-Gelmatrix wirken hierbei wie ein Molekular-Sieb, welches die Moleküle nach ihrer Größe auftrennt.

Zur Auftrennung der Nukleinsäuren wurde die benötigte Menge für 1 % Agarose in TAE-Puffer gelöst und kurz aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurden einige Tropfen Ethidiumbromid-Lösung zugegeben, in einen Kunststoffträger gegossen und zur Taschenbildung ein Kunststoffkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in eine Gel-Elektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die aufzutrennende DNA wurde im Verhältnis 1:5 mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die vorbereiteten Taschen pipettiert. Zur Abschätzung der Größe wurde der GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder als Marker verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 120 Volt für etwa 30 Minuten durchgeführt (abhängig von der Länge der DNA-Fragmente) und die einzelnen Banden wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten oder verdauten DNA-Fragmenten sowie Vektoren wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Machery & Nagel) entsprechend dem Herstellerprotokoll angewendet und in 20- 40 µL dH₂O oder dem mitgelieferten Elutionspuffer AE eluiert.

2.2.2.4 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren und Vektoren

Aufgereinigte DNA-Fragmente und Vektoren wurden verdaut, um „sticky ends“ für die anschließende Ligation zu erzeugen (präparativer Verdau). Die eingesetzten Restriktionsenzyme wurden passend zu dem verwendeten Vektor gewählt. Um eine Eigen-Ligation des Vektors zu verhindern, wurde Ansätzen, in denen nur ein Enzym eingesetzt wurde, CIP-Phosphatase zugesetzt, welche die erneute Ligation durch Desphosphorylierung der 5'-Überhänge verhinderte. Ein Restriktionsverdau wurde auch durchgeführt, um die Qualität und Integrität der Midi-DNA-Präparationen zu bestätigen (analytischer Verdau).

Die Inkubationszeit für eine präparativen Verdau betrug mindestens 3 h und für einen analytischen 1 h bei 37 °C.

	<u>Verdau PCR-Produkt</u>	<u>Verdau Vektor</u>
Cut Smart Puffer (10x)	2 µL	5 µL
DNA	25 µL	3 µL
Enzym 1	0,5 µL	0,25 µL
Enzym 2	0,5 µL	0,25 µL
H ₂ O	ad 30 µL	ad 50 µL

2.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmiden

Zur Erstellung eines neuen zirkulären Vektors wurden die linearisierte Plasmid-DNA und die PCR-Fragmente mit T4-Ligase ligiert, welche die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen den 3'- und 5'-Enden katalysiert. Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur für 30-60 Minuten inkubiert.

<u>Ligation mit Gibson-Mastermix</u>		<u>Ligation mit T4-DNA-Ligase</u>	
Gibson Mastermix	8 µL	T4-Ligase Puffer (10x)	1 µL
Vektor	50 ng	T4-Ligase	0,5 µL
Insert	x ng	Vektor	50 ng
		Insert	x ng
		H ₂ O	ad 10 µL

Inkubation für 1 h bei 50 °C

Inkubation für 90 min bei RT

2.2.2.6 DNA-Ligation über Gibson-Assembly

Eine alternative Methode für die Ligation von Insert und Vektor ist das Gibson-DNA-Assembly (120). Dieses Protokoll erlaubt die Ligation von bis zu 6 verschiedenen Fragmenten in ein linearisiertes Rückgrat-Plasmid. Anstelle von „sticky ends“ benötigt es überlappende Sequenzen (15-35 bp) zwischen den einzelnen Fragmenten, um ein zirkuläres Plasmid zu erzeugen. Der Ansatz muss für 60 Minuten bei 50 °C inkubiert

werden und kann anschließend direkt für eine Transformation in *E. coli* eingesetzt werden.

2.2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini-Prep und Midi-Prep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte aus Zellen, die aus einer 2 mL (Mini-Prep, für kleinere DNA-Mengen) oder 200 mL (Midi-Prep, größere DNA-Mengen) ÜN-Kulturen geerntet wurden. Nach der Zellernte wurde das NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel) oder PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega) gemäß den Herstellerprotokollen angewandt.

Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.8 Extraktion von genomischer DNA aus *P. falciparum*

Zur Bestätigung der korrekten Integration eines Plasmids in der zu modifizierenden Region im Genom von *P. falciparum* wurde die genomische DNA extrahiert und für die PCR-Analyse verwendet. Die Zellen einer Parasitenkultur mit einer hohen Parasitämie wurden geerntet und durch Zentrifugation bei 2000 xg für 3 Minuten pelletiert. Die Aufreinigung der DNA aus dem Blut erfolgte mit den QIAamp® DNA Mini Kits (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde in 500 µL HO eluiert und bei 4 °C gelagert.

2.2.2.9 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die genaue Konzentration, Reinheit und Integrität der Nukleinsäuren wurde mit einem Spektralphotometer (DS-11+-Spektralphotometer) durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.2.2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die korrekte Integration und zum Ausschließen von Mutation in der Sequenz der eingefügten DNA wurden aufgereinigte Plasmide sequenziert. Die Sequenzierung der Proben (3 µL Sequenzierungs-Primer, 100- 1000 ng DNA, ad 15 µL H₂O) wurde von einem Sequenzierungs-Labor (seqlab, Göttingen) durchgeführt.

2.2.2.11 DNA-Fällung mit Natriumacetat

Zur Fällung wurde die benötigte DNA-Menge mit 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5-fachen Volumen 100 % Ethanol gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA durch 20-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 500 µL 70%igem

Ethanol resuspendiert und dann weitere 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet wurde an der Luft getrocknet, bevor es in 50 µL TB-Puffer gelöst wurde.

2.2.2.12 Klonierung von CRISPR/Cas Plasmiden zur Genom-Editierung

Für die Modifizierung zu untersuchender Genom-Regionen stehen in *P. falciparum* inzwischen verschiedene zuverlässige Methoden zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde der Großteil der Transfektionen mit Hilfe von CRISPR/Cas basierten Systemen durchgeführt. Die verwendeten Primer können den Tabellen in 2.1.8 entnommen werden.

Als erstes wurden über das Online Tool CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/> (160, 161, 199)) zwei bis drei Guide-RNAs (gRNAs) pro Zielgen gewählt und als einsträngige Oligonukleotide bestellt, wobei zur Generierung der für die Klonierung in das Zielplasmid benötigten „sticky ends“ vier zusätzliche Nukleotide angehängt wurden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Ziel-Sequenz der gRNA in naher Umgebung des zu modifizierenden Teils des Ziel-Locus liegt, um *Off-Target* Effekte zu minimieren. Die gRNA selbst besteht aus 20 Nukleotiden, die komplementär zu einem DNA-Abschnitt sind, der strangabwärts der PAM-Sequenz (*protospacer adjacent motif*: NGG) liegt, die als Erkennungs-Motif für die Cas9 dient. Um ein doppelsträngiges DNA-Template für die gRNA zu erhalten, wurden je 10 µL der gegenläufigen einsträngigen Oligonukleotide, 10x *Annealing*-Puffer mit 70 µL ddH₂O in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gemischt und für 5 min bei 95° C im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz im Thermoblock belassen, bis dieser auf RT abgekühlt war. Die doppelsträngige gRNA-DNA-Sequenz wurde bis zur Ligation in den CRISPR/Cas9 Vektor bei -20° C gelagert.

Für die Ligation der gRNA-Templates standen je nach Art der durchzuführenden genetischen Modifikation Vektoren mit den gängigen Resistenzkassetten (DSM1 (*yDHODH*), WR (*hDHFR*) und BSD) sowie der Cas9 zur Verfügung. Genknockouts wurden durch Transfektion der Parasiten mit nur einem Plasmid durchgeführt, daher wurden hierfür Vektoren genutzt, die zusätzlich die homologen Regionen des Ziel-Locus enthielten. Bevor die Ligation in den ausgewählten Vektor erfolgen konnte, wurde 1 µg des Vektors über Nacht bei 37° C mit BsaI inkubiert und am nächsten Tag der linearisierte Vektor über das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up aufgereinigt. Für die Ligation wurde etwa 50 ng des Vektors eingesetzt und mit 1 µL gRNA-Template, 1 µL T4 Ligase Puffer und 0,5 µL T4 Ligase in einem Endvolumen von 10 µL für zwei Stunden bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 2 µL CutSmart Puffer, 1 µL AvrII und 7 µL H₂O zu dem Ansatz gegeben und für eine weitere Stunde bei 37° C inkubiert. Durch diesen Schritt sollte

verhindert werden, dass in dem Ansatz Plasmide, die zuvor nicht durch BsaI linearisiert wurden und somit kein gRNA-Template integriert haben, im Ansatz verbleiben. Durch den Verdau mit BsaI wird die zwischen den beiden Schnittstellen liegende AvrII Erkennungssequenz entfernt und nach der Insertion des gRNA-Templates sollte keine Linearisierung durch AvrII mehr möglich sein. Im nächsten Schritt wurden 10 µL des Ansatzes zur Transformation in *E. coli* XL-10 Gold Zellen eingesetzt.

Im Falle einer Co-Transfektion, bei der CRISPR/Cas9-Plasmid und ein Donor-Plasmid gemeinsam zur Transfektion in *P. falciparum* genutzt wurden, wurde über Gibson Ligation ein zweiter Vektor generiert. Diese Vektoren wurden auf Grundlage eines Amp-Ori-Plasmides erstellt. Sie enthielten zusätzlich flankiert von den homologen Sequenzen des Ziel-Locus die Sequenz für die einzuführenden Modifikationen.

Die fertigen Plasmide wurden erst für eine Transfektion eingesetzt, nachdem durch Sequenzierung die Richtigkeit der eingefügten Sequenzen bestätigt wurde.

Tabelle 4 Strategie zur Klonierung von CRISPR- Plasmiden

Konstrukt	Primer für Fragmente zum Gibson-Assembly	Beschreibung
DBLMSP1-KO Klonierung via Gibson Assembly in pCRISPRCas_KO_only verdaut mit BamHI und HindIII	Gibson_DBLMSP1_KO_Fra1_for Gibson_DBLMSP1_KO_Fra1_re Template: 3D7 gDNA	Homologer Bereich am 5' Ende des <i>dblmSP1</i> Locus mit angefügten Gibson-Überhängen und BamHI Schnittstelle
	Gibson_DBLMSP1_KO_Fra2_for Gibson_DBLMSP1_KO_Fra2_re Template: pH-gC Plasmid	WR Resistenzkassette mit angefügten Gibson-Überhängen
	Gibson_DBLMSP1_KO_Fra3_for Gibson_DBLMSP1_KO_Fra3_re Template: 3D7 gDNA	Homologer Bereich am 3' Ende des <i>dblmSP1</i> Locus mit angefügten Gibson-Überhängen und HindIII Schnittstelle

Konstrukt	Primer für Fragmente zum Gibson-Assembly	Beschreibung
GDV1-KO (DSM1) Klonierung via Gibson Assembly in pCRISPRCas_KO_only verdaut mit BamHI und HindIII	Gibson_GDV1_KO_Fra1_for Gibson_GDV1_KO_Fra1_re Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Homologe Sequenz im Bereich des 5' Ende des <i>gdv1</i> Locus mit angefügten Gibson-Überhängen und BamHI Schnittstelle
	Gibson_GDV1_KO_Fra2_for Gibson_GDV1_KO_Fra2_re Template: pY-gC Plasmid	DSM1-Resistenzkassette mit angefügten Gibson-Überhängen
	Gibson_GDV1_KO_Fra3_for Gibson_GDV1_KO_Fra3_re Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Zweiter Homologer Bereich des <i>gdv1</i> Locus direkt auf der ersten folgend mit angefügten Gibson-Überhängen und HindIII Schnittstelle
	Gibson_GDV1_KO_BSD_Fra1_for Gibson_GDV1_KO_BSD_Fra1_re Template: 3D7 gDNA	Homologe Sequenz im Bereich des 5' Ende des <i>gdv1</i> Locus mit angefügten Gibson-Überhängen und Sall Schnittstelle
GDV1-KO (BSD) Klonierung via Gibson Assembly in pCRISPRCas_KO_only verdaut mit EcoRI und Sall	Gibson_GDV1_KO_BSD_Fra2_for Gibson_GDV1_KO_BSD_Fra2_re Template: pB-gC Plasmid	BSD-Resistenzkassette mit angefügten Gibson-Überhängen
	Gibson_GDV1_KO_BSD_Fra3_for Gibson_GDV1_KO_Fra3_re Template: 3D7 gDNA	Zweiter Homologer Bereich des <i>gdv1</i> Locus direkt auf der ersten folgend mit angefügten Gibson-Überhängen EcoRI Schnittstelle

Konstrukt	Primer für Fragmente zum Gibson-Assembly	Beschreibung
GDV1-ASP/ASN Klonierung via Gibson Assembly in pHcam-GDV1-GFP-DD verdaut mit BamHI und NotI	Gibson_BamHI_GDV1_5'_for Gibson_GDV1_Asn(389+400)_rev_new Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Einfügen einer BamHI Schnittstelle am 5'Ende der GDV1 Sequenz und Codons für ALA(389 und 400) zur Mutagenese innerhalb der Gibson Überhänge
	Gibson GDV1_Ala/Asn_Fra2_for Gibson_NotI_GDV1_GDV1 3'_rev Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Einfügen einer NotI Schnittstelle am 3'Ende der GDV1 Sequenz und inklusive Gibson Überhänge
GDV1-ASP/ALA Klonierung via Gibson Assembly in pHcam-GDV1-GFP-DD verdaut mit BamHI und NotI	Gibson_BamHI_GDV1_5'_for Gibson_GDV1_Asp/Ala_Fra1_rev Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Einfügen einer BamHI Schnittstelle am 5'Ende der GDV1 Sequenz inklusive Gibson Überhänge
	Gibson GDV1_Ala(408+410)_for Gibson_NotI_GDV1_GDV1 3'_rev Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Einfügen einer NotI Schnittstelle am 3'Ende der GDV1 Sequenz und Codons für ALA(408 und 410) zur Mutagenese innerhalb der Gibson Überhänge
GDV1-ALA Klonierung via Gibson Assembly in pHcam-GDV1-GFP-DD verdaut mit BamHI und NotI	pH Gibson_BamHI_GDV1_5'_for Gibson_GDV1_Asn(389+400)_rev_new Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Einfügen einer BamHI Schnittstelle am 5'Ende der GDV1 Sequenz und Codons für ALA(389 und 400) zur Mutagenese innerhalb der Gibson Überhänge

Konstrukt	Primer für Fragmente zum Gibson-Assembly	Beschreibung
GDV1Δ384-421 Klonierung via Gibson Assembly in pHcam-GDV1-GFP-DD verdaut mit BamHI und NotI	Gibson GDV1_Ala(408+410)_for Gibson_NotI_GDV1_GDV1 3'_rev Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Einfügen einer NotI Schnittstelle am 3'Ende der GDV1 Sequenz und Codons für ALA(408 und 410) zur Mutagenese innerhalb der Gibson Überhänge
	Gibson_BamHI_GDV1_5'_for Gibson_GDV1_1-384_Fra1_rev Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Einfügen einer BamHI Schnittstelle am 5'Ende der GDV1 und eine Deletion der AS zwischen ASN(384) und THR(421) WT-Sequenz inklusive Gibsonüberhänge
	Gibson GDV1_381-420_Fra2_for Gibson_NotI_GDV1_GDV1 3'_rev Template: pHcam-GDV1-GFP-DD Plasmid	Einfügen einer NotI Schnittstelle am 3'Ende der GDV1 Sequenz und eine Deletion der AS zwischen ASN(384) und THR(421) WT-Sequenz inklusive Gibsonüberhänge

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE nach Lämmli (162) wurden Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Zwischen zwei eingespannte Glasplatten, wurde zuerst das zuvor frisch angesetzte Trenngel gegossen und bis zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das ebenfalls frisch angesetzte Sammelgel hineingegossen und ein

Kamm eingesetzt. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels wurde mit einem Online-Tool (<https://www.cytographica.com/lab/acryl2.html>) berechnet und dementsprechend angesetzt.

Die polymerisierten Gele wurden in die vorgesehenen Kammern eingesetzt und mit SDS-Laufpuffer befüllt. Die aufzutrennenden Proben wurden zuvor mit 5x SDS-Laufpuffer versetzt und für 5 min bei 95° C erhitzt. Bevor die Proben (10-25 µL) in die Taschen des Gels pipettiert wurden, wurden sie kurz zentrifugiert. Zur Größenkalkulation wurde der *Chameleon Duo Prestained Protein Ladder* (1-2 µL) verwendet. Nach dem Beladen erfolgte die Auftrennung zuerst für 30 min bei 100 Volt und anschließend für etwa 1 ½ h bei 120 Volt, bis die Laufront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.2.3.2 Immunologische Detektion von Proteinen im Western Blot

Nachdem Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, konnten diese über einen Western Blot mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Hierfür wurden die Proteine im Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Für den Proteintransfer wurden zunächst ein feuchter Schwamm, drei Lagen ebenfalls feuchtes Whatman-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das SDS-Gel, weitere drei Lagen Whatman-Papier und ein Schwamm in die Halterung eingelegt. Beim Einsetzen der Halterung in den Blot-Tank musste darauf geachtet werden, dass sich die Membran auf der Anode befindet, da die Proteine durch ihre negative Ladung in diese Richtung wandern und somit vom Gel auf die Membran übertragen werden. Die Kammer wurde mit Transfer-Puffer gefüllt und anschließend für 1 h eine Spannung von 90 Volt bei 4° C angelegt.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei RT zum Blockieren der freien Bindestellen in 5% Milchpulver in TBS inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in 5% Milch in TBS-T bei 4° C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für je 10 min in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, ebenfalls in der entsprechenden Verdünnung in 5% Milchpulver in TBS-T, erfolgte für 1-2 h im Dunkeln bei RT. Bevor die Proteine mit dem Odyssey® Fc Imaging System detektiert wurden, wurde die Membran 3x für 10 min in TBS gewaschen.

2.2.4 Zellkulturtechniken für *Plasmodium falciparum*

2.2.4.1 Kontinuierliche Kultivierung von *P. falciparum*

Die *P. falciparum* Parasiten wurden in RPMI-Komplettmedium (mit 2 mM Cholin) bei 5 % Hämatokrit (humanes Erythrozytenkonzentrat Blutgruppe 0⁺ oder B⁺; Blutspendedienst UKE, Hamburg) in 5 mL oder 10 mL Petrischalen kultiviert. Die Kulturen wurden in

luftdichten Kammern in einer sauerstoffarmen Atmosphäre (5% CO₂, 1 % O₂ und 94 % N₂) bei 37 °C gehalten und das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Aufgrund der 48 Stunden dauernden intra-erythrozytären Entwicklung, die innerhalb eines Zyklus zu einer Verzehnfachung der Parasitämie führt, wurde die Kultur auf 1% Parasitämie verdünnt. Wurde eine höhere Parasitenanzahl benötigt, wurde das Medium täglich gewechselt, bis die gewünschte Parasitämie erreicht war.

2.2.4.2 Giemsa-Färbung von Blutausstrichen

Die Parasitämie und die Entwicklung der Parasiten wurden durch Giemsa-Färbung dünner Blutausstriche überwacht. Diese färbt durch eine Komplexbildung mit der DNA im Zellkern den Parasiten violett an. Das Fehlen eines Zellkerns lässt die Erythrozyten durch das schwach gefärbte Zytoplasma hingegen nur leicht bläulich erscheinen. Dazu wurden 0,3 µL der Parasitenkultur auf einen Glasobjektträger übertragen, mit Methanol fixiert und 10-15 Minuten in Giemsa-Lösung gefärbt.

2.2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Parasiten-Kryostabilaten

Zur Dauerhaften Lagerung von Parasiten wurden Kryostabilate aus Kulturen mit einem möglichst hohen Anteil an Ringstadien (> 5 %) in der Zentrifuge bei 800 xg für 3 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die verbleibenden Blutzellen in 1 mL *Malaria Freezing Solution* (MFS) aufgenommen und in ein Kryogefäß überführt. Diese Kulturen konnten dann bei -80 °C dauerhaft gelagert werden und bei Bedarf wieder in Kultur genommen werden.

Hierfür wurden die Kryogefäße zum Auftauen für 5 min in 37 °C Wasserbad gestellt und die aufgetaute Kultur in einem 15 mL Falcon für 3 min bei 800 xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde in 1 mL *Malaria Thawing Solution* (MTS) resuspendiert. Das Pellet wurde nach erneuter Zentrifugation in 5 mL RPMI-Komplettmedium gewaschen und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert.

2.2.4.4 Begrenzte Saponin-Lyse zur Extraktion von *P. falciparum* aus Erythrozyten

Eine niedrige Konzentration von Saponin, führt zu einer Lyse der Erythrozyten, somit können Parasiten auf diese Weise aus den Blutzellen isoliert werden. Die Behandlung mit Saponin führt zu einer Desintegration der Erythrozyten-Membran und der PVM, so dass die intakten Parasiten durch Sedimentation von der Zelldebris getrennt werden können. Für die Saponin-Lyse wurden 10 mL einer Parasitenkultur mit 5-10% Parasitämie durch Zentrifugation (800 xg, 4 min) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10x Pellet-Volumen eiskaltem Saponin (0,06%-0,15%) in PBS aufgenommen und

resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 5 Minuten bei 4000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das verbleibende Pellet in 1 mL eiskaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde mehrmals in eiskaltem PBS durch Zentrifugation bei 16 000 U/min für 1 Minute und anschließender Resuspension in einem weiteren mL eiskaltem PBS gewaschen, bis der Überstand klar blieb.

2.2.4.5 Synchronisierung von Parasiten im Ringstadium

Da sich die einzelnen Entwicklungsstadien von *P. falciparum* sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrer Biochemie deutlich unterscheiden, wurden alle Experimente mit synchronen Kulturen durchgeführt. Eine Methode zur Synchronisierung einer Parasitenkultur ist die Behandlung mit Sorbitol, welches eine Erhöhung des osmotischen Drucks bewirkt, was zur Lyse von Trophozoiten und Schizonten führt, während die Parasiten im Ringstadium und die nicht infizierten Erythrozyten unversehrt bleiben.

Eine Parasitenkultur wurde in ein 15-mL-Falcon-Röhrchen überführt und 4 Minuten lang bei 800 xg sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet im 10x Volumen 5% (w/v) D-Sorbitol resuspendiert und anschließend für mindestens 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen sedimentiert (800 xg; 4 min), der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet wurde in RPMI resuspendiert und in eine Petrischale überführt.

2.2.4.6 Isolierung von Schizonten über einen Percoll-Gradienten

Für die Trennung der Schizonten von anderen Stadien und nicht infizierten Erythrozyten wurde ein Percoll-Gradient verwendet. Percoll ist eine Lösung aus kolloidalen Siliziumdioxidpartikeln, die in einem Dichtegradienten verwendet werden, um Objekte durch Zentrifugation nach ihrer Größe zu trennen. In einem 15-mL-Falcon wurde eine 60%ige Percoll-Lösung gegeben und mit maximal 10 mL resuspendierter Parasitenkultur mit einer hohen Schizonten-Parasitämie überschichtet. Während der anschließenden Zentrifugation bei 800 xg für 5 min ohne Beschleunigung oder Bremse wurden die Schizonten als dunkle Schicht im Phasenübergang zwischen der Percoll und der RPMI angereichert. Die Schizontenschicht wurde abgenommen, in ein Falcon überführt und einmal in 5 mL RPMI gewaschen. Die isolierten Schizonten konnten entweder zur Reinvasion oder für die Mikroskopie eingesetzt werden.

2.2.4.7 Enge Synchronisation durch Reinvasion

Um die Parasitenproliferation auf reproduzierbare Weise zu untersuchen, war ein Synchronisieren der Parasiten in ein enges Zeitfenster während ihrer Entwicklung

erforderlich. Um dies zu erreichen, wurden die Parasiten durch Isolierung von Schizonten über einen Percoll-Gradienten und anschließende Sorbitol-Behandlung eng synchronisiert.

Bevor die isolierten Schizonten in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt wurden, welches mit 250 µL Erythrozyten und 250 µL RPMI gefüllt war, wurden sie einmal in RPMI gewaschen. Die Schizonten wurden für 30 Minuten inkubiert (37 °C; 700 U/min) und dann in eine 5-mL-Petrischale mit vorgewärmtem RPMI überführt und für weitere 2 ½ Stunden inkubiert.

Um eine Lyse der Parasiten, die nicht innerhalb der letzten 3 h reinvadiert waren zu erreichen, wurden sie mit Sorbitol behandelt. Nach der Synchronisierung sollten nur noch Parasiten im Ringstadium 0 bis 3 Stunden nach der Infektion (hpi) vorhanden sein.

2.2.4.8 Transfektion von *P. falciparum*

Es gibt unterschiedliche Techniken für die Transfektion von *P. falciparum*, aber die zuverlässigste ist die Elektroporation, bei der das Anlegen eines starken elektrischen Feldes zu einer Permeabilisierung der Membranen führt, so dass die DNA in die Zelle gelangen kann.

a. Transfektion von Parasiten im Ringstadium mit dem BioRad-System

Zur Transfektion von Parasiten im Ringstadium wurden 100 µg sterile Plasmid-DNA in TE-Puffer verwendet. Für CRISPR-Transfektionen mit einem Cas9-Plasmid und einem Donor-Plasmid wurden äquivalente Mengen beider Plasmide verwendet. Die vorbereitete Plasmid-DNA (2 µg/µL) wurde mit Cytomix auf ein Gesamtvolumen von 400 µL aufgefüllt.

Anschließend wurden 5 mL einer Parasitenkultur mit einer Parasitämie von mindestens 5 % junger Ringe resuspendiert und zur Sedimentation (800 xg; 4 min) in ein 15 mL Falcon überführt. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in dem Plasmid-DNA enthaltenden Cytomix resuspendiert. Zur Transfektion wurde die Mischung in eine Elektroporations-Küvette (2 mm; BioRAD) pipettiert und mit dem Gene Pulser Xcell (310 V; 950 µF; ∞ Ω) elektroporiert. Im Anschluss wurden die Parasiten sofort in eine 10-mL-Petrischale mit vorgewärmtem RPMI mit 5 % Hämatokrit gegeben. Nach 24 Stunden wurde der erforderliche Selektionsmarker hinzugegeben, und das Medium für die folgenden 5 Tage täglich gewechselt.

b. Transfektion von Schizonten mit dem Amaxa-System

Für Transfektionen mit dem Lonza-System wurden 25- 50 µg Plasmid-DNA gefällt und in 10 µL sterilem TE-Puffer gelöst.

Die segmentierten Schizonten einer 10-mL-Parasitenkultur (10% Parasitämie) wurden über einen Percoll-Gradienten isoliert. Die isolierten Schizonten wurden in 100 µL TB-

Puffer, der zuvor mit dem DNA-haltigen TE-Puffer gemischt wurde, resuspendiert. Das Schizonten-DNA-Gemisch wurde in eine Elektroporations-Küvette (2 mm; BioRAD) gegeben und mit dem Nucleofector II AAD-100N (Programm: U-033) elektroporiert. Anschließend wurden die Schizonten in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, das mit vorgewärmten 250 µL Erythrozyten und 250 µL RPMI gefüllt war. Die Reaktionsgefäße wurden für 30 min inkubiert (37 °C; 700 rpm). Nach mindestens 30 min wurden die Parasiten in eine 5-mL-Petrischale mit vorgewärmtem RPMI überführt. Analog zu den Transfektionen im Ringstadium wurde der erforderliche Selektionsmarker nach 24 Stunden zugegeben und das Medium in den folgenden 5 Tagen täglich gewechselt.

2.2.4.9 Separierung einzelner Klone durch limitierende Verdünnung (Plaque Assay)

Trotz hinzufügen eines Selektionsmarkers nach der Transfektion, um auf positive transgene Parasiten zu selektieren, können einige Parasiten in der Kultur verbleiben, die weiterhin das WT-Gen exprimieren.

Um einzelne Klone zu isolieren, die ausschließlich das gewünschte modifizierte Protein exprimieren, wurde ein Plaque-Assay (278) durchgeführt.

Begonnen wurde mit der Verdünnung einer Ring-Kultur (mindestens 0,6 % Parasitämie) in RPMI-Medium (0,75 % Hämatokrit), indem 1,5 mL der Parasitenkultur mit 8,5 mL RPMI-Medium in ein 15-mL-Falcon gegeben wurden. Für die folgenden Schritte wurden 40 mL RPMI mit 300 µL Erythrozyten in einem 50 mL Falcon gemischt. In einer 96-Well-Platte wurde in jede Vertiefung 200 µL der nicht infizierten Erythrozyten in RPMI gegeben.

Bevor die verdünnte Ring-Kultur in die 96-Well-Platte pipettiert wurde, erfolgte eine schrittweise Verdünnung (1:10 pro Verdünnungsschritt) um die Parasitämie auf 0,0006 % einzustellen. Nach dem letzten Verdünnungsschritt wurden je 100 µL in jede Vertiefung der zweiten Reihe der Platte pipettiert, gut durchmischt und anschließend mit derselben Spitze 100 µL in die Vertiefung der darauffolgenden Reihe gegeben. Dies wurde bis zur letzten Reihe wiederholt. Die 96-Well-Platte wurde für 10-11 Tage bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde jede Vertiefung der Platten mit einem inversen Lichtmikroskop auf Einzel-Plaques untersucht. Der Inhalt der Vertiefungen, die einzelne Parasiten enthielten, wurde in eine 6-Well-Platte mit frischem RPMI (5 % Hämatokrit) und ggf. einem Selektionsmarker übertragen. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt, bis Parasiten zu finden waren.

2.2.4.10 Induktion der Exzision *loxP*-Intron flankierter Sequenzen

Zur Untersuchung der Auswirkungen der induzierbaren Modifikationen, die mit dem DiCre/*loxP*-Rekombinase-System erzeugt wurden, wurde die Exzision der WT-Sequenz durch Zugabe von Rapalog (250 nM; AP21967, Clontech) zu einer synchronen Ring-Kultur induziert. Um eine Aktivität der DiCre-Rekombinase über die volle Dauer des Experiments zu gewährleisten, wurde Rapalog bei jedem Wechsel des Mediums erneut zu der Kultur gegeben.

2.2.4.11 Wachstumsanalysen mittels Durchflusszytometrie

Das Beobachten der Proliferation der Parasiten über mehrere Zyklen, ist eine einfache Methode, um einen phänotypisch relevanten Einfluss des zu untersuchenden Proteins auf die Fitness und das Überleben des Parasiten zu erkennen, da es sich meist in einer Inhibition des Wachstums widerspiegelt. Eine schnelle Methode zur Quantifizierung der Parasitämie in einer Kultur ist die Durchflusszytometrie.

Ein Anfärben der DNA erfolgte durch die Zugabe von Dihydroethidiumbromid (DHE) und SYBR Green, wodurch sie von nicht infizierten Erythrozyten, die keine DNA enthalten, unterschieden werden konnten. Für die Färbung der Parasiten-DNA wurden 0,25- 1 μ L SYBR Green (0,25x- 1x) und 1 μ L DHE (5 μ g/mL) zu 20 μ L einer vollständig resuspendierten Kultur hinzugefügt. Nach Zugabe von 80 μ L RPMI wurde die Mischung mindestens 30 min lang im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Die Parasitämie wurde durch Messung von mindestens 100.000 Singlet-Ereignissen mit dem Durchflusszytometer NovoCyte 1000 (ACEA) bestimmt.

Für den Proliferations-Assay wurde eine Kultur durch Reinvasion eng synchronisiert. Im Trophozoiten Stadium wurde die Parasitämie auf 0,1 % eingestellt, und die Zunahme der Parasitenanzahl wurde über 2 bis 3 Zyklen mit dem Durchflusszytometer alle 48 Stunden gemessen. Nach der Probenahme im zweiten Zyklus wurde die Kultur im Verhältnis 1:10 verdünnt, um Effekte aufgrund einer zu hohen Parasitämie zu vermeiden. Während des gesamten Zeitraums wurde das Medium täglich gewechselt.

2.2.4.12 Egress- und Invasions-Assays

Verschiedene Effekte wie gestörte Stoffwechselwege können zu einem Rückgang der Parasitenproliferation führen. Häufig ist jedoch eine verringerte Fähigkeit zum Egress oder zur Invasion von Erythrozyten die Ursache, was durch die Bestimmung der Effizienz der Invasion bzw. des Egress bestimmt werden kann.

Die Parasitämie von eng synchronisierten Trophozoiten wurde mittels Durchflusszytometrie auf ca. 1 % eingestellt. Zur Quantifizierung wurden dünne Giemsa-gefärbte Blutaussstriche bei 36 und 54 hpi angefertigt. Später wurden Bilder dieser

Ausstriche mit einem 63x-Objektiv mit einem Lichtmikroskop aufgenommen. Pro Parasitenlinie und Zeitpunkt wurden mindestens 20 Bilder aufgenommen und die Anzahl der Erythrozyten, Schizonten und Ringe ausgezählt. Zur Berechnung der Anzahl der Erythrozyten wurde ein Makro in FIJI verwendet, die Parasiten wurden manuell gezählt. Für die Invasions-Rate wurde die Anzahl der Ringe pro ruptiertem Schizonten berechnet. Um festzustellen, ob es einen Effekt auf den Egress gibt, wurde das Verhältnis der rupturierten Schizonten beider Zeitpunkte bestimmt.

2.2.4.13 Commitment-Assays

Zur Quantifizierung der sexuellen Konversions-Raten von Parasiten, die zur sexuellen Differenzierung fähig sind, wurde das sexuelle Commitment durch Änderung der Kulturbedingungen, z. B. des Cholingehalts (3D7-Linien) oder durch Zugabe von Shield-1 (3D7-iGP-Linien) ausgelöst.

Eine synchrone Kultur mit etwa 1% Ringe, wurde in zwei Hälften aufgeteilt. In einer Hälfte wurde durch die Zugabe von Shield-1 (3D7-iGP) bzw. durch das Fehlen von Cholin (3D7) Commitment induziert. Im nächsten Zyklus nach der Reinvansion, wurden die Parasiten, die sich weiterhin im asexuellen Zyklus entwickelten, durch die Zugabe von 50 mM N-Acetyl-Glucosamin (GlcNac) entfernt.

Zur späteren Dokumentation wurden Giemsa-gefärbte Ausstriche ab dem Tag der Induktion (Day -2) und den folgenden Tagen (Day -1 bis Day 3) angefertigt. Von den zur Auswertung benötigten Ausstrichen wurden min 20 Bilder unter dem Lichtmikroskop bei 63x Vergrößerung gemacht. Weitere Ausstriche wurden am 7. Und am 10. Tag angefertigt. Während des gesamten Zeitraums wurde das Medium täglich gewechselt und ab Tag 8 kein GlcNac mehr hinzugegeben.

2.2.5 Mikroskopie

2.2.5.1 Lichtmikroskopie

Mit Giemsa gefärbte Blutausstriche wurden entweder bei 63x oder 100x Vergrößerung mit Immersionsöl unter einem Leica DM2000 LED Mikroskop betrachtet. Für einen Überblick über die Parasitämie und um Aufnahmen mit der LeicaDMC2900 Kamera zu tätigen wurde die 63x Vergrößerung genutzt. Zur genaueren Beurteilung der Morphologie die 100x.

2.2.5.2 Vorbereitung des Parasitenmaterials

a. Lebendpräparate

Zur Lokalisation von Fluoreszenz-markierten Protein wurden die Parasiten als Lebendpräparate unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierfür wurde 500 µL

einer vollständig resuspendierten Kultur in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Bei Bedarf wurden die Zellkerne mit HOECHST33342 (0,45 µg/mL) angefärbt, indem für 15 min bei 37° C inkubiert und anschließend in RPMI gewaschen wurde. Bevor die Zellsuspension auf die Objektträger gegeben werden konnten, wurde sie kurz zentrifugiert der Überstand bis auf 40 µL abgenommen und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden 4 µL auf einen Objektträger übertragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

b. Fixierung von Parasitenmaterial mit Paraformaldehyd

Für die Detektion über Antikörper mussten die Parasiten im Vorfeld fixiert werden. Hierfür wurde aus der zu untersuchenden Kultur Zellmaterial entnommen, auf einem Objektträger dünn ausgestrichen und an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurde der Ausstrich mit einem hydrophoben Stift (DAKO) umkreist. Innerhalb dieses Kreises wurden 100 µL Fixierlösung (4% Paraformaldehyd + 0,1% Glutaraldehyd in PBS, steril filtriert) pipettiert und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellen 50 µL 0,1% TRITONX-100 in PBS auf die Objektträger gegeben. Nach 10 min wurde erneut 3x mit PBS gewaschen.

Alternativ wurden die Objektträger bis zur Verwendung vor der Fixierung bei -70° C gelagert.

c. Fixierung mit Methanol

Sollte auf eine Fixierung mit Paraformaldehyd verzichtet werden, so wurden die Objektträger nach dem Trocknen zum Fixieren für einige Minuten in eiskaltes Methanol getaucht und bei Bedarf nach vollständigem Trocknen bei -70° C gelagert.

2.2.5.3 Immunfluoreszenz-Assay (IFA) transgener Parasiten

Zur Untersuchung der Lokalisation von Proteinen im Parasiten wurden Immunfluoreszenz-Assays durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können Proteine in fixierten Parasiten über spezifische Antikörper detektiert werden und anschließend über einen zweiten Fluorophor-gekoppelten spezifischen Antikörper unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden.

Bei -70° C gelagerte Objektträger wurden zuerst bei RT aufgetaut und an der Luft getrocknet. Sollte noch kein Kreis mit dem DAKO Stift um die fixierten Parasiten gezogen worden sein, so wurde dies als erstes nach dem Auftauen nachgeholt.

Als erstes wurden etwa 200 µL 3% BSA in PBS-T (0,05% Tween20 in 1x PBS) auf die Objektträger gegeben und zum Blockieren der freien Bindestellen für 1 h bei RT inkubiert. Nachdem die BSA-Lösung entfernt wurde, wurden etwa 100 µL des primären Antikörpers in 1% BSA in PBS-T aufgetragen und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen und 100 µL des Fluorophor-gebundenen sekundären

Antikörpers (ebenfalls mit 1% BSA-PBST verdünnt) auf den Objektträger pipettiert und im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach einer Stunde wurden 100 µL HOECHST in PBS (Verdünnung 1:1000) dazu gegeben. Etwa 15 min nach Zugabe des HOECHST wurde erneut 3x mit PBS gewaschen und die Objektträger im Dunkeln vollständig getrocknet. Auf die getrockneten Objektträger wurden etwa 10 µL Vectashield pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.5.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zuvor fixierte Parasitenpräparate und Lebendpräparate von transgenen Parasiten wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Neben den Fluoreszenz-markierten Proteinen, konnte die DNA im Zellkern durch Färbung mit Hoechst33342 sichtbar gemacht werden. Die Präparate wurden mit einem Leica DM6B Mikroskop untersucht, welches mit einer Leica DFC9000 GT Kamera ausgestattet war. Zur genauen Bestimmung der Lokalisation wurde ein 100x Objektiv und zur Übersicht ein 63x bzw. 40x Objektiv genutzt. Für die einzelnen Kanäle standen folgende Filterspektren zur Verfügung:

	Excitation	Emission
DAPI (Hoechst)	325-375	435-485
GFP	460-500	512-542
TXR (mScarlet)	542-582	604-644
Y5	590-650	602-738

2.2.6 Bioinformatische Methoden

2.2.6.1 Modellierung von Proteinstrukturen

Um die mögliche Struktur eines Proteins vorherzusagen, wurde zum einen I-TASSER (*Iterative Threading ASSEMBly Refinement*) genutzt, bei dem es sich um eine Methode zur Vorhersage von dreidimensionalen Strukturmodellen handelt (320, 321). Hierbei werden in Protein Datenbanken gespeicherte Struktur Templates auf Ähnlichkeiten untersucht, indem die einzelnen Aminosäuren der Query-Sequenz in der Target-Sequenz positioniert werden und berechnet wird wie „passend“ sie für diese Position ist. So wird am Ende das am besten passende Template ausgewählt und aus mehreren Fragmenten die wahrscheinlichste Struktur berechnet. Zur Vorhersage der Struktur von GDV1 wurde die auf PlasmodDB (<https://plasmodb.org/plasmo/app>) angegebene Sequenz der 3D7

Linie mit einer Länge von 599 AA genutzt. I-TASSER wurde über das [Yang Zhang Lab](#) zur Verfügung gestellte Online-Tool genutzt.

Neben I-TASSER wurde ColabFold v1.5.3 genutzt, welches Proteinstrukturen durch eine Kombination aus MMseqs2 und AlphaFold2 berechnet und eine schnelle Alternative zur Vorhersage ist (196). Die Query-Sequenz wurde im [AlphaFold2.ipynb](#) Online Tool eingegeben und die erhaltenen Daten im Google Drive gespeichert.

2.2.6.2 Identifizierung funktionaler Domänen und konservierter Sequenz-Bereiche

Zur Identifizierung der potenziellen katalytisch aktiven Domänen innerhalb der Struktur von GDV1, wurden im ersten Schritt die hochkonservierten Bereiche innerhalb der Sequenz des Proteins identifiziert. Hierfür wurde ein multiples Sequenz-Alignment aller Primaten-infizierender mit MAFFT durchgeführt. Dieses Programm führt Alignments auf Basis von Algorithmen durch, die Sequenzen mit der Hilfe von diskreter Fourier-Transformation clustern. Die daraus resultierende Konsensus-Sequenz konnte für die Suche nach Homologien dieser konservierten Bereiche in Proteinen anderer Organismen genutzt werden. Hierfür wurde [HHpred](#) genutzt, welches auf der Query Sequenz verschiedene Datenbanken mit Proteinen bekannter Struktur durchsucht und über Sequenz-Alignments mögliche strukturell ähnliche Bereiche findet. Mit den Sequenzen der wahrscheinlichsten Ergebnisse wurde ein weiteres Alignment durchgeführt, um einzelne innerhalb der Domänen konservierte Aminosäuren zu identifizieren.

Eine weitere Möglichkeit, um homologe Bereiche zu identifizieren, ist über eine vorhandene [AlphaFold](#) Modellierung mit Hilfe eines Alignments mit [FoldSeek](#). Hierfür wurde das AF-Q8I2G6-F1-Modell von GDV1 mit einem durchschnittlichen pLDDT von 57,35 als Query für die Suche genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Effekts von spezifischen Punktmutationen auf die Funktion von CyRPA

3.1.1 Lektin-Bindestellen und ASP-Box

Basierend auf den *in vitro* gesammelten Daten, bezüglich der Affinität zur Bindung von endständig an Glykanen gebundenen Sialinsäuren (auch als Neuraminsäuren bezeichnet) des Proteins CyRPA, sollte die Rolle dieser Lektin-Aktivität während des Invasions-Prozesses mit Hilfe von transgenen Parasiten genauer untersucht werden. Während dieser Studien wurden fünf Aminosäurereste der potentiellen Lektin-Bindestelle als Haupt-Interaktionspartner für die Bindeaktivität des α -2,6-SLN-Ac-CyRPA Komplex prognostiziert. Hierbei handelte es sich um die Aminosäuren E148, I149, S152, I155 und G209 (Abbildung 14)(69).

Daher wurden analog zu den durchgeführten *in vitro* Experimenten diese Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht. Da sich die Lektin-Bindestelle nahe der Sialidase-Motif enthaltenden ASP-Box befindet, welche aber keine Sialidase-Aktivität aufweist, wurden die Aminosäuren S201 und G205 ebenfalls mit ausgewählt und gegen Alanin ausgetauscht (Abbildung 14).

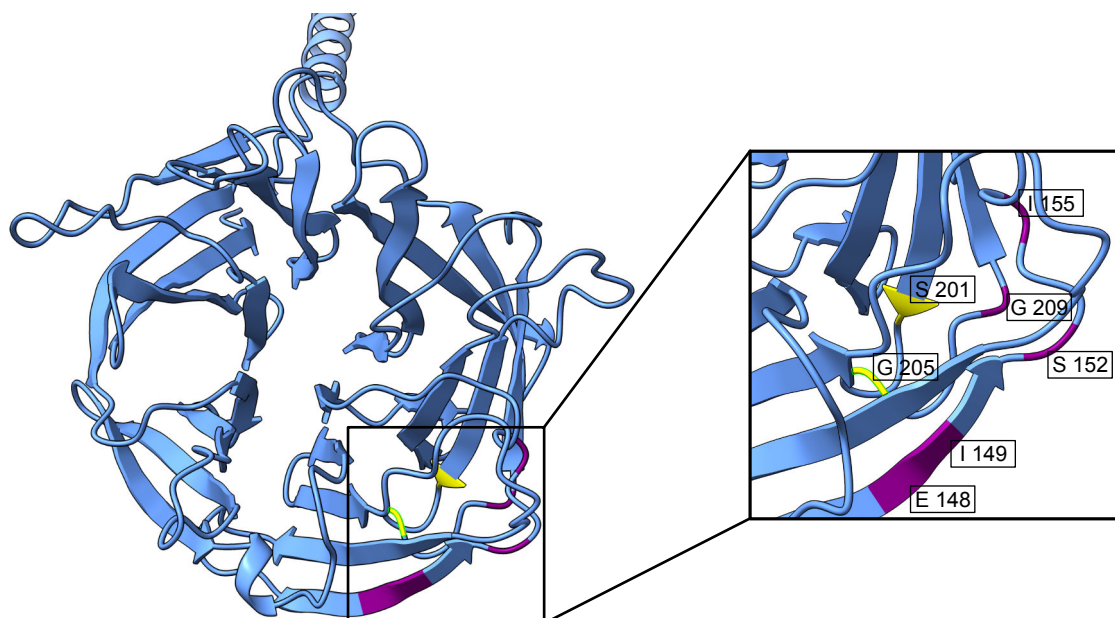


Abbildung 14 Position der ausgetauschten Aminosäuren innerhalb der dreidimensionalen Proteinstruktur von CyRPA. In der durch AlphaFold2 (151) vorhergesagten Struktur von CyRPA (hellblau) sind die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren der Lektin-Bindestelle (violett) und ASP-Box (gelb) farblich hervorgehoben. Auf der rechten Seite ist die Region vergrößert dargestellt.

Neben den sieben Varianten, bei denen eine Punktmutation eingefügt wurde, wurde zusätzlich eine mit angepassten recodonisierten Basentriplets dem WT-Gen entsprechende synthetische Sequenz generiert (Tabelle im Anhang). Die recodonisierte Variante sollte als Kontrolle dienen, um einen möglichen Einfluss auf die Proliferation der Parasiten bedingt durch das DiCre Rekombinase System bzw. des HA-Tags ausschließen zu können.

3.1.2 Generieren transgener Parasiten mit Hilfe des konditionalen DiCre Rekombinase Systems

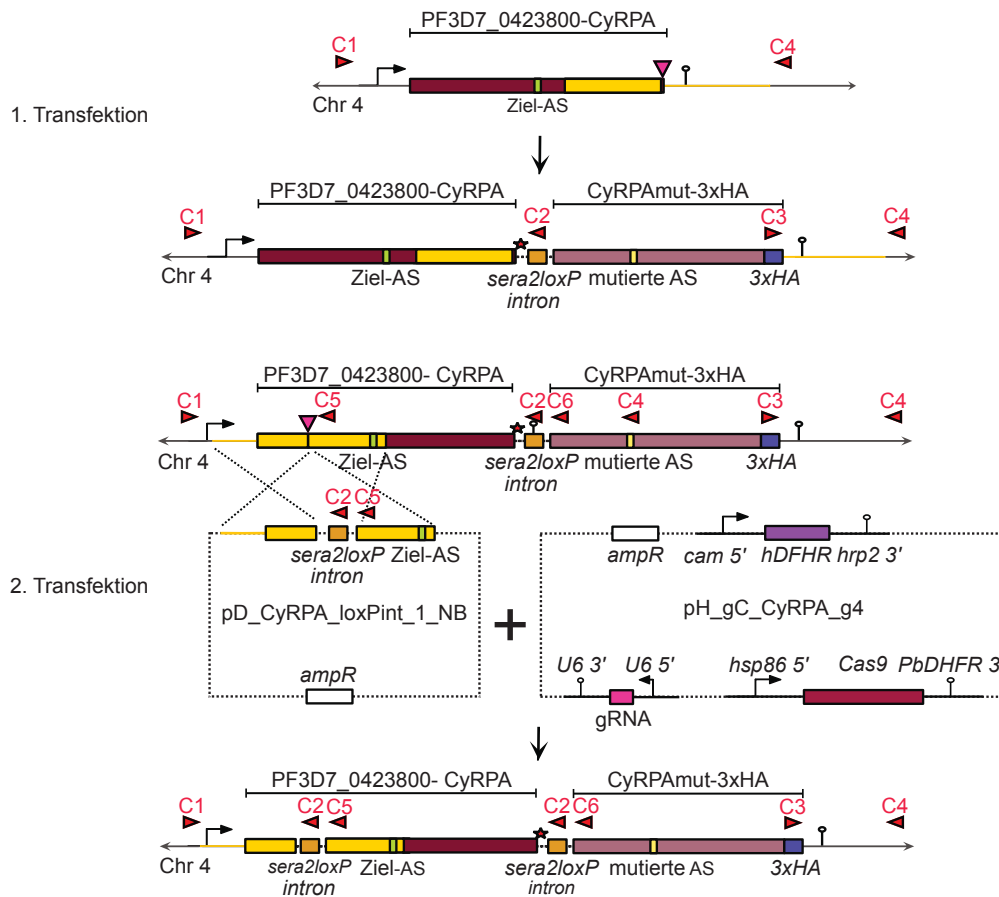
Bei CyRPA handelt es sich um ein für den Parasiten essentielles Protein. Da eingangs nicht abschätzbar war, wie stark der Einfluss der genetischen Modifikation auf die Funktion des Proteins sein würden, wurde eine Methode gewählt, die nicht einen direkten Austausch von Basen innerhalb der codierenden Sequenz zur Folge hatte, sondern über das Einfügen einer modifizierten Sequenz am 3' Ende des Locus und eine anschließende induzierbare Exzision der ursprünglichen Sequenz des Ziel-Locus. Grundlage dieses System ist die Cre Rekombinase, welche in der Lage ist kurze 34 bp lange Sequenzen, *loxP* genannt, zu erkennen und an diesen Stellen die DNA zu spalten und neu zu verknüpfen (209). Durch die Expression der Rekombinase in Form von zwei inaktiven Peptiden, die durch eine Rapamycin-bindenden FKBP Domänen zu einem enzymatisch aktiven Protein dimerisiert werden können (54), kann die Exzision durch die Gabe von Rapamycin bzw. Rapalog induziert werden. Die konditional enzymatisch aktive DiCre Rekombinase katalysiert spezifisch die Exzision der *loxP* Stellen flankierten DNA-Sequenz. Diese kurzen *loxPs* können als stille Mutation innerhalb eines ORFs in Form eines künstlichen Introns (*loxPint*) eingefügt werden (209). Für die vorliegende Arbeit wurde eine klonale Parasitenlinie (II-3 (3D7/*p230pDiCre*)) genutzt, welche die DiCre-Expressionskassette über doppelte homologe Rekombination im *p230p* Locus integriert hat und somit eine Expression der Cre Rekombinase ohne die zusätzliche Gabe eines Selektionsmarkers dauerhaft gewährleistet ist (156). Die beiden *loxP* Erkennungsstellen und die modifizierten CyRPA Sequenzen wurden in zwei Schritten via CRISPR/Cas9 Genom Editierung am Ziel Locus eingefügt. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Donor Plasmide und CRISPR Plasmide kloniert.

Im ersten Schritt sollte am 3' Ende eine der beiden *loxP* Introns gefolgt von der veränderten CyRPA Sequenz, die am 3' Ende zusätzlich eine „3xHA-tag“ codierende Sequenz enthielt, eingefügt werden. Die veränderten Sequenzen wurden ausgehend von 846 bp der genomischen CyRPA Sequenz (1718 – 2564) recodonisiert und mit für die Punktmutationen codierenden Codons als synthetische Gene bestellt (Anhang). Als

Grundlage für dieses Plasmid, wurden die anderen benötigten Fragmente von geeigneten Templates amplifiziert und über Gibson Assembly zusammengeführt. Als homologe Bereiche wurden, beginnend 441 bp stromaufwärts des Stopcodons am 3' Ende und ausgehend vom 3' Ende weitere 418 bp stromabwärts, Bereiche der genomischen Sequenz amplifiziert. Zwischen diesen beiden Bereiche wurden mit Hilfe der Gibson Überhänge das *SERA2* Intron mit der *loxP* Stelle gefolgt von der modifizierten Sequenz und dem 3x HA-Tag eingefügt. Um ein funktionales Donor Plasmid zu erhalten, wurden diese drei Fragmente mit einem AmpOri- Fragment zu einem zirkulären Plasmid zusammengefügt. Für den zweiten Schritt wurden die einzelnen Schritte analog durchgeführt. Ähnlich dem Donor Plasmid des ersten Schrittes wurden zwei direkt aufeinanderfolgende Bereiche am 5' Ende der genomischen Sequenz von CyRPA als homologe Bereiche amplifiziert. Für den ersten Bereich wurden 231 bp vor und 243 bp hinter dem Startcodon und für den zweiten weitere 371 bp stromabwärts amplifiziert. Zwischen diese beiden Bereiche wurde erneut ein *SERA2loxP* Intron codierendes Fragment über Gibson Überhänge eingefügt und die drei Fragmente mit einem AmpOri- Fragment zu einem zirkulären Plasmid zusammengeführt.

Da die Modifikation in zwei Transfektionsschritten in das Genom der Parasiten eingefügt wurde, musste jeweils ein Cas9-Plasmid mit einem anderen Selektionsmarker genutzt werden. Mit Hilfe des Online Tools CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/> (160, 161, 199)) wurden jeweils zwei geeignete gRNA Sequenzen ausgewählt und in das Cas9-Plasmid Rückgrat kloniert. Zum Einfügen der rekodierten Sequenz und des ersten *loxP* Introns wurde das pY-gC Plasmid (132), welches eine DSM1-Resistenz kodierende *yDHODH*-Kassette enthält und für den zweiten Schritt ein pH-gC (103), welcher stattdessen eine *hDFHR*-Kassette zur Ausbildung einer WR-Resistenz enthält, genutzt (Abbildung 15 A und Anhang).

A



B

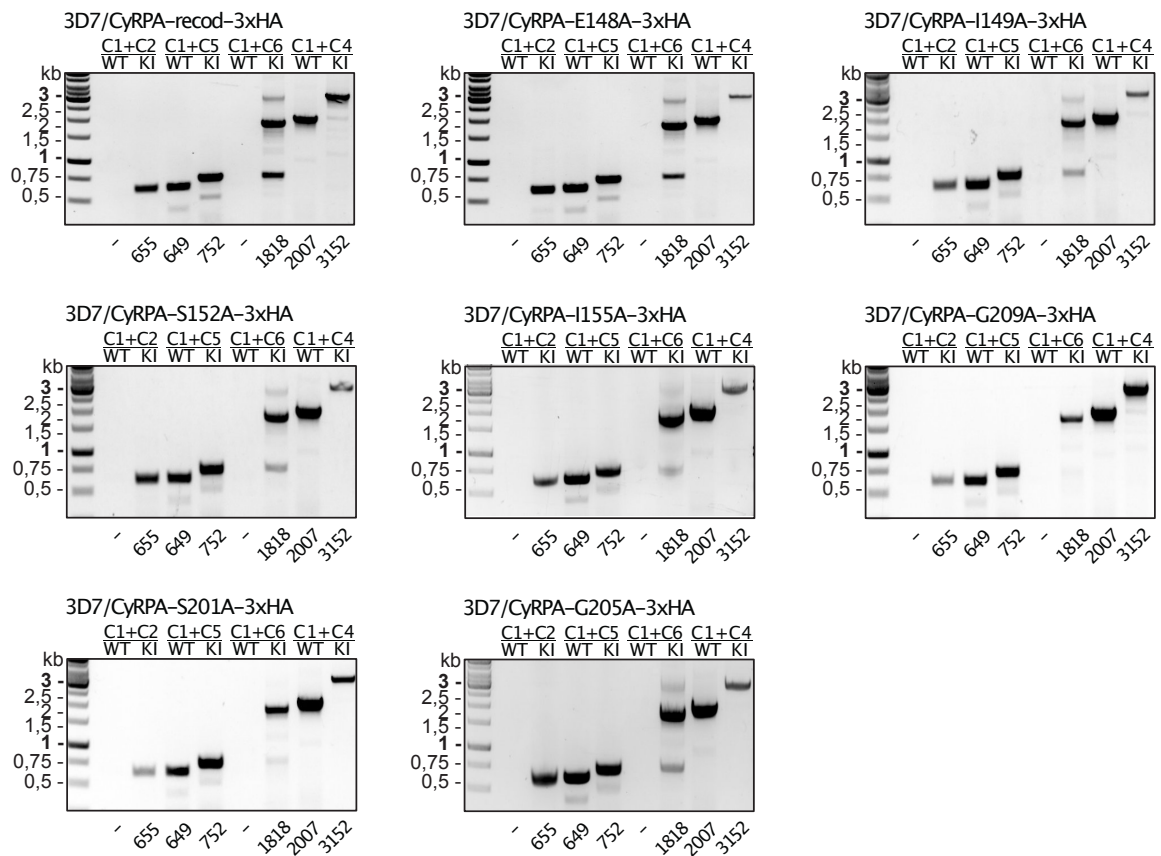


Abbildung 15 Modifikation des CyRPA Locus mittels CRISPR/Cas-basierter Integration. (A) Schema für die schrittweise Integration der mutierten Sequenz und der beiden loxP Introns. Mit zwei aufeinanderfolgenden Transfektionen wurden innerhalb der homologen Bereiche (gelb) zuerst ein loxP Intron (orange) gefolgt von der mutierten Sequenz (altrosa) und dem 3xHA-tag (lila). Mit der zweiten Transfektion wurde ein weiteres loxP Intron (orange) mit Hilfe der beiden Plasmide (pD_CyRPA_loxPint_1_NB und pH_gC_CyRPA_g4) innerhalb der Zielsequenz (bordeaux) eingefügt. Die Bindestellen der gRNAs sind mit einem Dreieck (pink) gekennzeichnet und das Stop Codon mit einem Stern (rot). (B) Integrations-PCR mit genomischer DNA der acht transgenen Parasitenlinien und WT-Parasiten zur Kontrolle der erfolgreichen Integration in das Parasitengenom. Bindestellen der verwendeten Primer sind im Schema in (A) dargestellt (rote Dreiecke).

Die fertigen Plasmide wurden im ersten Schritt in II-3-Parasiten und anschließend in positive Integranten transfiziert (Abbildung 15 A). Nach Co-Transfektion mit den beiden Plasmiden, wurde auf positive Transfektanten unter Gabe von WR selektiert und eine Integration über eine PCR mit geeigneten Primern für alle 8 CyRPA Varianten bestätigt (Anhang). Im nächsten Schritt wurden diese 8 Linien jeweils mit dem Donor und dem Cas9 Plasmid transfiziert und unter Gabe von DSM1 auf positive Transfektanten selektiert. Mittels PCR wurde zusätzlich zur Integration der loxP Elemente überprüft, dass sich keine Parasiten, deren Genom den unveränderte WT Locus enthält, mehr in den entsprechenden Kulturen befanden (Abbildung 15 B).

3.1.3 Expression der verschiedenen CyRPAmut Varianten nach induzierter Exzision

Nachdem die erfolgreiche Integration der Mutationen innerhalb des CyRPA Locus für die Expression der verschiedenen CyRPA Varianten nachgewiesen werden konnte, wurde als nächstes überprüft, ob eine Induktion der Expression der Cre Rekombinase durch Gabe von 250 mM Rapalog zur Expression des modifizierten Proteins führt.

Auf genomischer Ebene wurde der Nachweis der erfolgreichen Exzision mittels PCR und geeigneten Primern (Abbildung 16 A+B) geführt. Das modifizierte Protein sollte indirekt über die Detektion des 3x HA-tag mit Hilfe von α -HA Antikörpern in einem Western Blot nachgewiesen werden.

Zunächst wurden die Kulturen im Abstand von etwa 16 h 2x mit Sorbitol synchronisiert. Anschließend wurden diese Ring Kulturen in zwei Hälften aufgeteilt und zu einer Hälfte 250 nM Rapalog gegeben, während die andere als unbehandelte Kontrolle mitgeführt wurde. Basierend darauf, dass es sich bei CyRPA um ein Invasions-beteiligtes Protein handelt und das Transkriptionsmaximum zwischen 40 und 44 hpi liegt (159), wurden die Proben im späten Schizonten Stadium genommen. Um einen vorzeitigen Egress zu verhindern, wurden beide Kulturen mit „Compound 2“ behandelt (17).

Mit Hilfe der Exzisions-PCR konnte für die 5 CyRPA Varianten und die recodierte Kontroll-Linie in den unbehandelten Kulturen sowohl die loxP Intron flankierte als auch der WT-Locus inklusive der durch die Transfektion ins Genom integrierten Sequenz nachgewiesen werden (Abbildung 16 B: Primerpaare C1+C5 und C1+C4). In den mit Rapalog behandelten Kulturen war hingegen eine schwache Bande erkennbar, die darauf schließen lässt, dass bei einigen Parasiten die Exzision nicht stattgefunden hat (Abbildung 16 B: Primerpaare C1+C5). Gleichzeitig konnte in den mit Rapalog behandelten hingegen eine verkürzte Sequenz im Vergleich zur Kontrolle amplifiziert werden, was wiederum auf eine erfolgreiche Exzision hinweist (Abbildung 16 B: Primerpaare C1+C6 und C1+C4). Ebenso ließ sich in den unbehandelten Kontrollen auf derselben Höhe eine schwache Bande erkennen, was auf eine nicht induzierte Exzision auf einem geringen Level hindeutet (Abbildung 16 B: Primerpaare C1+C6 und C1+C4). Da diese Hintergrund-Exzision in gleichem Maße bei allen Linien nachgewiesen wurde, ist beim späteren Vergleich der Linien mit der Kontroll-Linie kein Einfluss auf die Signifikanz der gewonnenen Ergebnisse zu erwarten.

Im Western Blot konnte in den mit Rapalog behandelten Kulturen mit Hilfe des α -HA Antikörpers das CyRPAmut knapp unterhalb einer Größe von 38 kDa detektiert werden, das als Ladekontrolle dienende BiP (MG 72 kDa) wurde in allen Proben knapp unterhalb von 70 kDa nachgewiesen (C). Das native CyRPA hat eine Größe von 42 kDa, da das BiP ebenfalls etwas unterhalb der erwarteten Größe detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass nach Induktion und erfolgreicher Exzision CyRPAmut Varianten wie WT-CyRPA exprimiert und prozessiert werden. Im Gegensatz zur PCR konnte in den unbehandelten Proben kein modifiziertes CyRPA nachgewiesen werden, was den Schluss zulässt, dass kein modifiziertes Protein bzw. in nicht nachweisbarer Menge exprimiert wird.

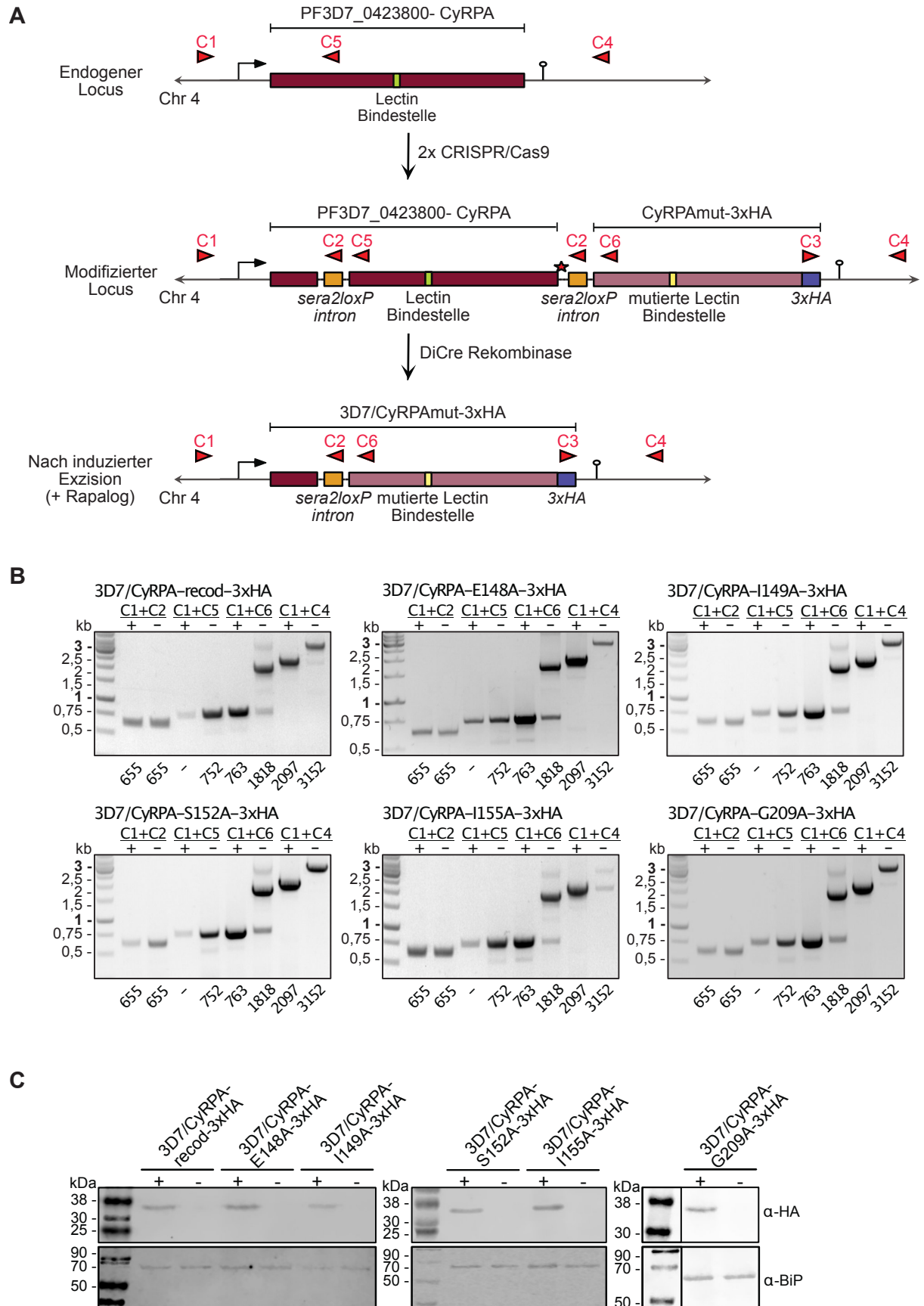


Abbildung 16 Expression der CyRPAmut Varianten durch induzierte Exzision im Ziellocus. (A) Schematische Darstellung des WT-cyrrpa Locus, des modifizierten Locus und des modifizierten Locus mit der eingeführten Punktmutation innerhalb der Lektin-Bindestelle nach induzierter DiCre-

vermittelter Exzision. (B) Exzisions-PCR mit genomischer DNA der 6 transgenen Parasitenlinien nach Gabe von Rapalog (+) und den zugehörigen unbehandelten Kontrollen (-). Die Bindestellen der verwendeten Primer (rote Dreiecke) sind im Schema (A) dargestellt. (C) Western Blot mit Lysaten von Rapalog behandelten (+) und unbehandelten (-) Parasiten der transgenen CyRPA Linien zur Detektion des 3xHA-markierten CyRPAmut Varianten (42 kDa) mittels α -HA Antikörpers. Als Ladekontrolle diente BiP (72 kDa) und als Marker wurde der Cameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder (LI-COR) verwendet.

Für die anderen beiden Varianten, deren veränderte Aminosäuren innerhalb der ASP-Box lokalisiert sind, wurde ebenfalls die erfolgreiche Exzision mit Hilfe von PCR und Western Blot nachgewiesen (Abbildung 17 A). Ähnlich wie bei den fünf in der Lektin-Bindestelle lokalisierten Varianten lässt sich eine nicht induzierte Hintergrundaktivität der Rekombinase anhand der Banden der unbehandelten Kontrollen erkennen (Abbildung 17 B: Primerpaare C1+C6 und C1+C4). Ebenso wie eine schwache Wildtyp-Bande in den Rapalog behandelten Kulturen (Abbildung 17 B: Primerpaar C1+C5). Über einen Western Blot ließ sich auch hier nur in den behandelten Proben HA getaggttes CyRPA mit einer Größe von knapp 38 kDa detektieren (Abbildung 17 C).

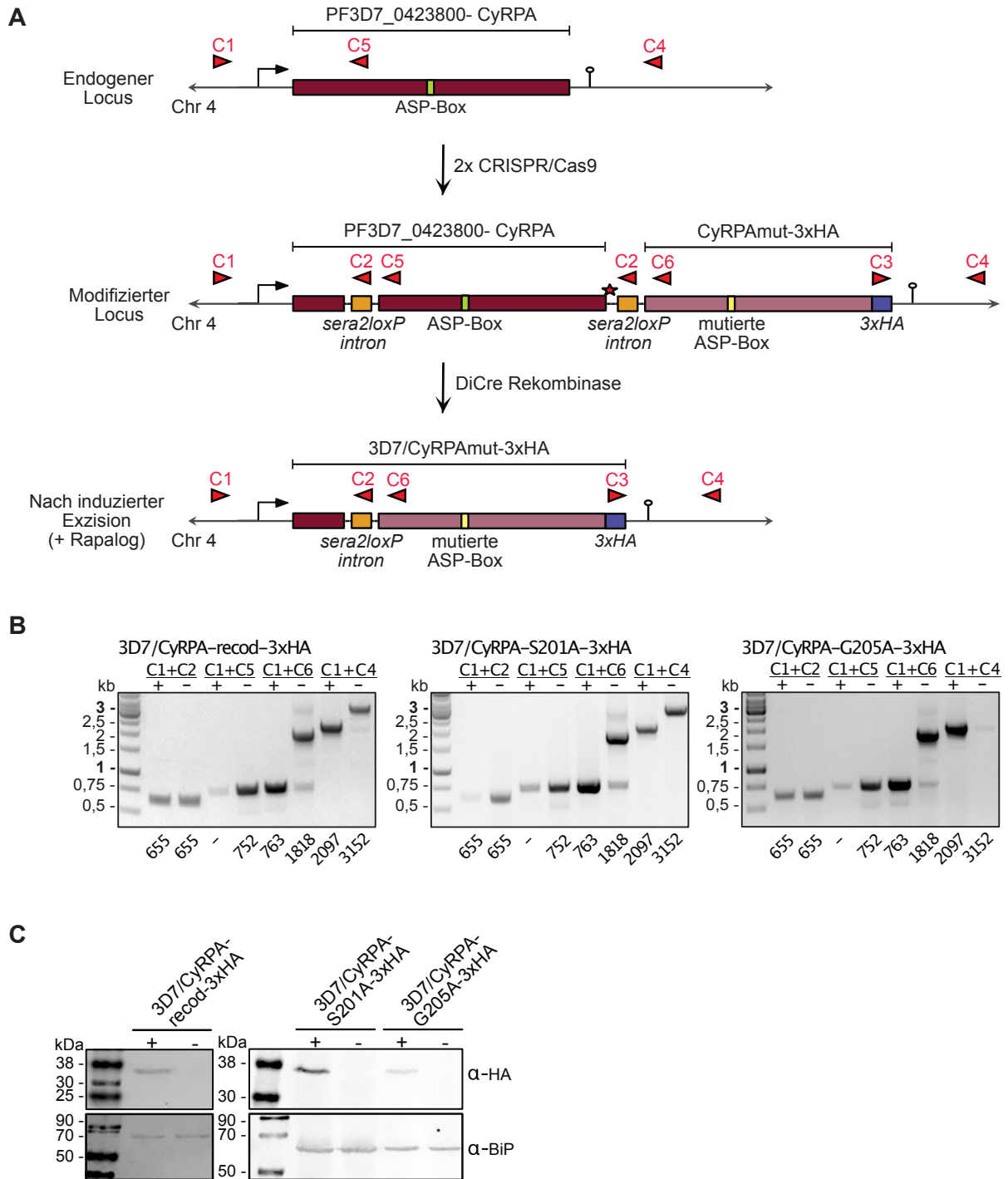


Abbildung 17 Expression der CyRPAmut Varianten durch induzierte Exzision im Ziellocus.
 (A) Schematische Darstellung des WT-CyRPA Locus, des modifizierten Locus und des modifizierten Locus mit der eingeführten Punktmutation innerhalb der ASP-Box nach induzierter DiCre-vermittelter Exzision. (B) Exzisions-PCR mit genomischer DNA der 6 transgenen Parasitenlinien nach Gabe von Rapalog (+) und den zugehörigen unbehandelten Kontrollen (-). Die Bindestellen der verwendeten Primer (rote Dreiecke) sind im Schema (A) dargestellt. (C) Western Blot mit Lysaten von Rapalog behandelten (+) und unbehandelten (-) Parasiten der transgenen CyRPA Linien zur Detektion des 3xHA-markierten CyRPAmut Varianten (42 kDa) mittels α -HA Antikörpers. Als Ladekontrolle diente BiP (72 kDa) und als Marker wurde der Cameleon® Duo Pre-stained Protein. Ladder (LI-COR) verwendet.

3.1.4 Ein Austausch der Aminosäuren beeinträchtigt nicht die Bindung zwischen CyRPA und dem monoklonalen Antikörper α -CyRPA C10

Für verschiedene CyRPA-spezifische monoklonale Antikörper (mAK) konnte eine inhibierende Wirkung auf die *in vitro* Proliferation von *P. falciparum* gezeigt werden (81, 99). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die verschiedenen mAK an unterschiedliche Ziel-Epitope an der Oberfläche des Proteins binden (102). Das von dem mAK C12 erkannte Epitop liegt im 2. und 3. Propeller der Proteinoberflächenstruktur. Ein weiterer inhibierender mAK ist C10, der in derselben Studie der Epitop-Gruppe A, welche sich über die Aminosäurereste 26 bis 352 erstreckt, zugeordnet wurde. Welche Reste hierbei genau für die Erkennung des mAK C10 wichtig sind, ist bis jetzt noch nicht bekannt.

Über Bindung des C10 lässt sich CyRPA somit indirekt über die Detektion des Antikörpers im Parasiten nachweisen. Die ausgetauschten Aminosäuren der 7 generierten *CyRPA*-Varianten sind innerhalb des vom C10 Antikörper-Epitops lokalisiert, daher wurde, neben einer eventuellen Mislokalisierung der veränderten Proteine durch die eingeführten Mutationen bzw. des 3xHA, mittels IFA überprüft, ob die Antikörper weiterhin an das Protein binden und ob eine Co-Lokalisation mit dem HA-Signal besteht. Für die IFA wurden aus eng synchronisierten späten, jeweils wieder mit Rapalog behandelten und unbehandelten, Schizonten-Kulturen (40-44 hpi), luft-getrocknete Ausstriche angefertigt. In den anschließend mittels PFA fixierten Parasiten wurden das CyRPA über α -CyRPA C10 und α -HA und einen sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper unter dem Mikroskop sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, lokalisierte CyRPA in der unbehandelten Kultur (bezeichnet als CTRL) der Kontroll-Linie 3D7/CyRPA-recod-3xHA das Protein in einem für das CyRPA typischen punktierten Muster am apikalen Ende der Merozoiten und einem schwächeren Signal in Richtung des vorderen Pols nahe dem Zellkern (83). In den behandelten Kulturen (bezeichnet als +RAPA) wurde neben dem α -CyRPA zusätzlich das α -HA detektiert und beim Übereinanderlegen der beiden Signale zeigte sich eine partielle Co-Lokalisation der Signale (Abbildung 19: 3D7/CyRPA-recod-3xHA+RAPA und 3D7/CyRPA-E148A-3xHA +RAPA). Dies bestätigte zum einen die Ergebnisse der PCR und des Western Blots zum anderen zeigte es, dass auch nach Induktion und Transkription der modifizierten Gensequenz, das exprimierte modifizierte CyRPA im erwarteten Organell lokalisiert, da das gefundene Lokalisationsmuster dem der unbehandelten Kontrolle entsprach.

Im Vergleich zur Kontroll-Linie lokalisiert CyRPA in den unbehandelten CTRL Parasiten in dem gleichen punktierten Muster. Wobei diese Lokalisation noch deutlicher in freien

Merozoiten (Abbildung 19: siehe 3D7/CyRPA-E148A-3xHA CTRL) erkennbar war. Auch bei den mit Rapalog behandelten Parasiten ließ sich für die fünf Varianten ein α -CyRPA und ein α -HA Signal detektieren (Abbildung 18 und 19). Die Signale lokalisierten hier ebenfalls in dem zuvor gezeigten Muster der Kontroll-Linie und es war weiterhin eine teilweise Überlappung der Signale zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass ein Austausch der Aminosäuren innerhalb der Lektin Bindestelle des CyRPA nicht zu einer Mislokalisierung des Proteins führt und es somit weiterhin an seinem Funktionsort lokalisiert. Des Weiteren führen die Modifikationen nicht zu einer Beeinträchtigung der Bindung des α -CyRPA C10 Antikörpers. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Invasionsinhibierende Wirkung des Antikörpers nicht auf das Blockieren der Lektin-Bindestelle zurückzuführen ist.

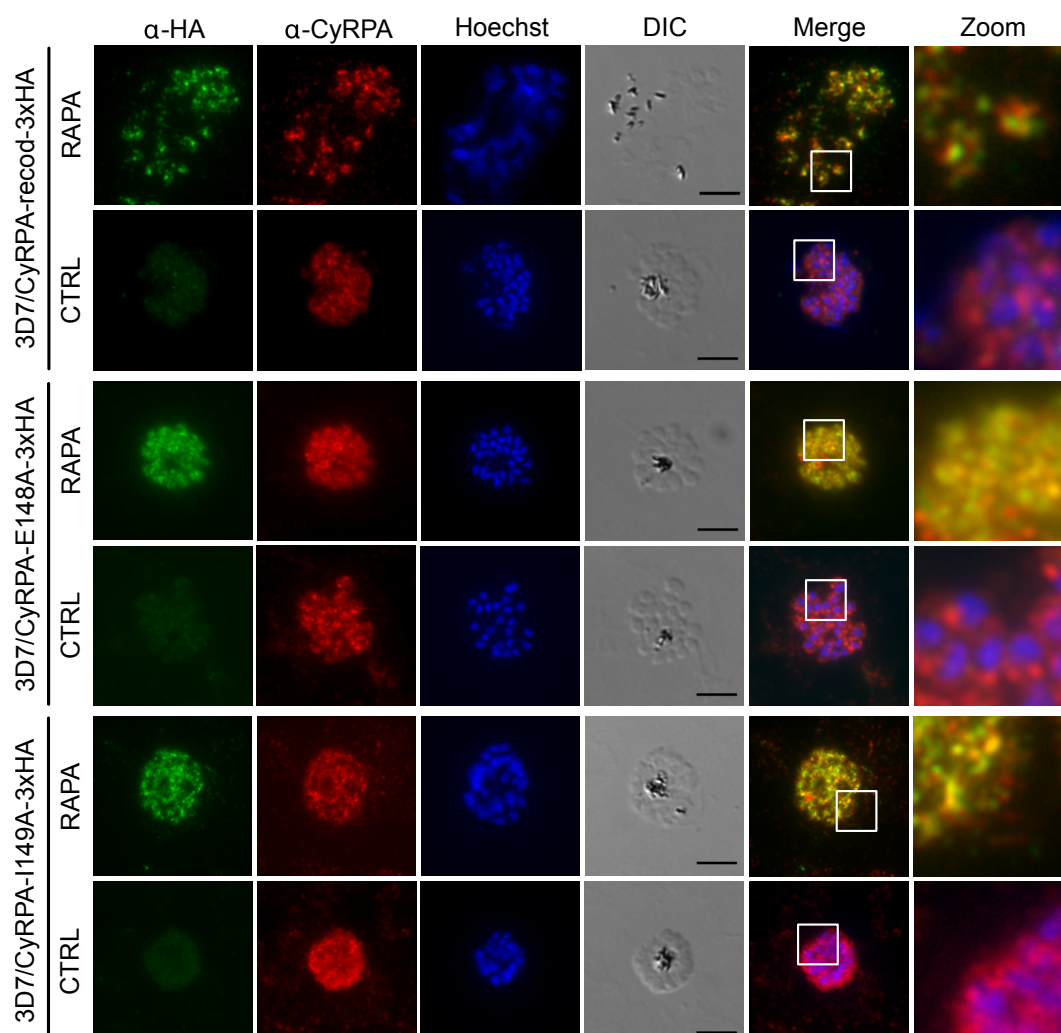


Abbildung 18 Lokalisation der modifizierten CyRPA Varianten und Bindung des α -CyRPA C10 Antikörpers. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Schizonten Rapalog behandelter (RAPA) und unbehandelter (CTRL) Parasiten der transgenen CyRPA Linien. CyRPA wurde mit α -HA (grün) und α -CyRPA C10 (rot) detektiert. Die Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt (blau). Maßstab= 5 μ m.

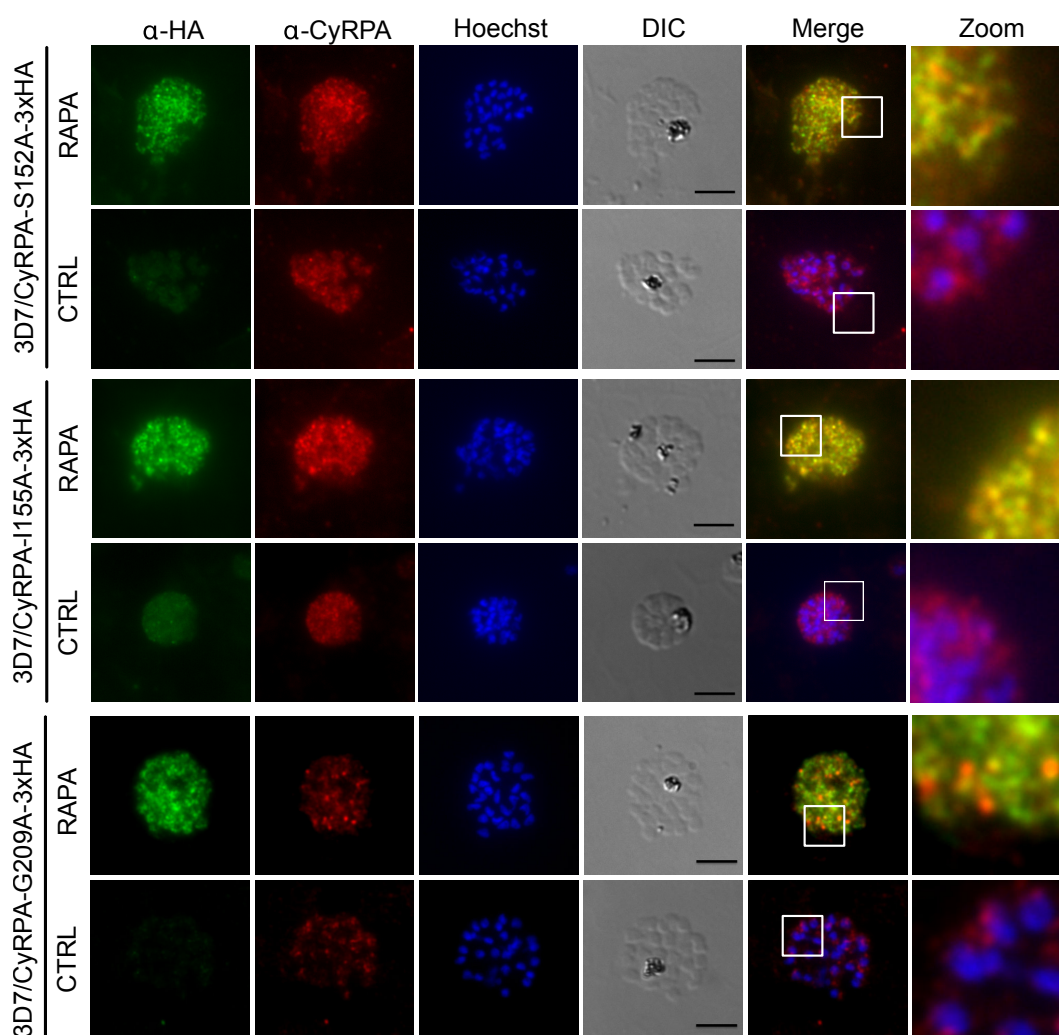


Abbildung 19 Lokalisation der modifizierten CyRPA Varianten und Bindung des α -CyRPA C10 Antikörpers. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Schizonten Rapalog behandelter (RAPA) und unbehandelter (CTRL) Parasiten der transgenen CyRPA Linien. CyRPA wurde mit α -HA (grün) und α -CyRPA C10 (rot) detektiert. Die Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt (blau). Maßstab= 5 μ m.

Die Bilder der IFA für die beiden Varianten der ASP-Box sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Lektin-Bindestelle. Auch hier ließ sich die Lokalisation des modifizierten Proteins am deutlichsten in freien Merozoiten erkennen (Abbildung 20: 3D7/CyRPA-S201A-3xHA +RAPA). Daher ist auch hier von keiner Beeinträchtigung der Bindung des α -CyRPA C10 Antikörpers auszugehen und ebenfalls auch von keiner Mislokalisierung der modifizierten Proteine.

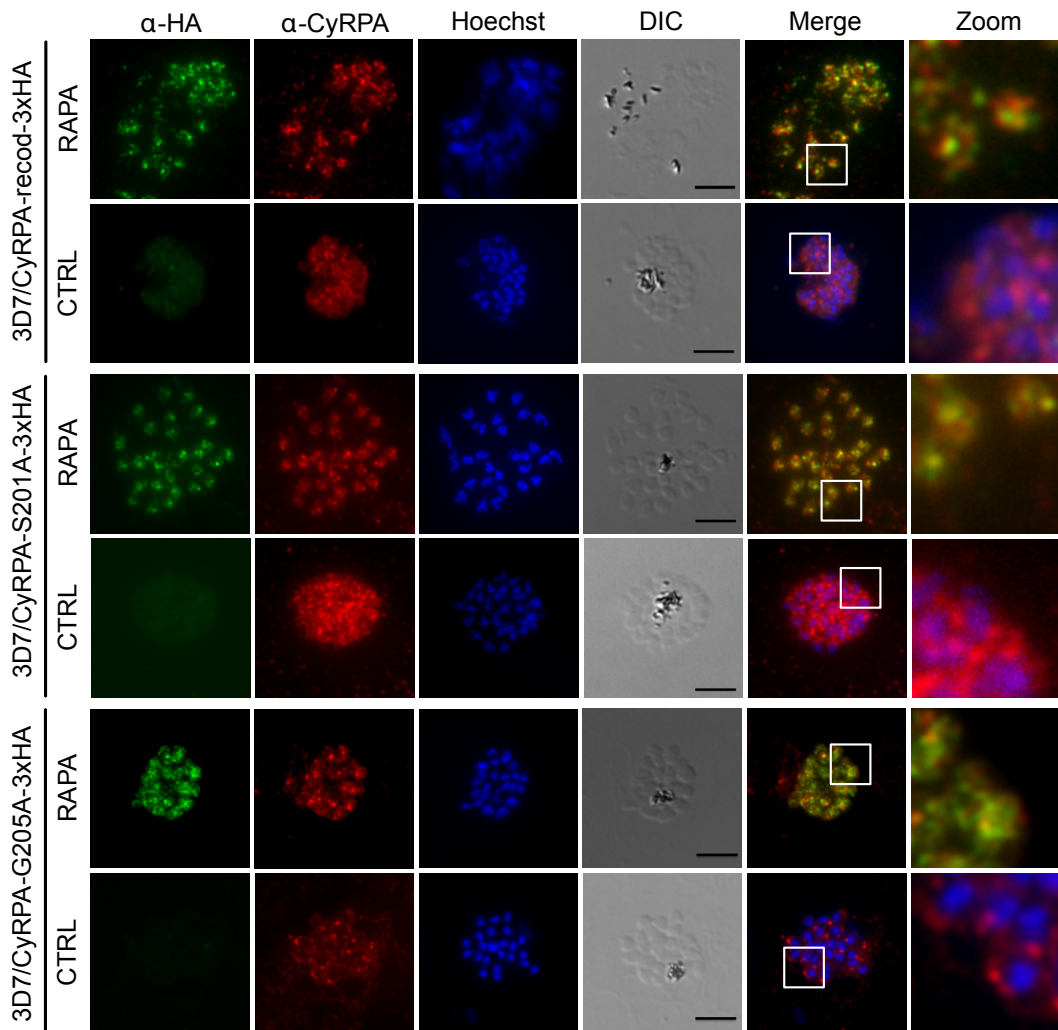


Abbildung 20 Lokalisation der modifizierten CyRPA Varianten und Bindung des α -CyRPA C10 Antikörpers. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Schizonten Rapalog behandelter (RAPA) und unbehandelter (CTRL) Parasiten der transgenen CyRPA Linien. CyRPA wurde mit α -HA (grün) und α -CyRPA C10 (rot) detektiert. Die Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt (blau). Maßstab= 5 μ m.

3.1.5 Die Expression der verschiedenen CyRPA Varianten hat unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation der Parasiten und die Effizienz der Invasion

In einem Wachstumsassay wurde der Einfluss der einzelnen Mutationen auf die Proliferation der Parasiten untersucht. Hierbei wurde die Zunahme der Parasitämie über drei Replikationszyklen mittels Durchflusszytometrie aufgenommen und die gewonnenen Daten der Rapalog behandelten Ansätze zu denen der unbehandelten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Der Austausch der Aminosäuren innerhalb der Lektin-Bindestelle führte im Einzelnen im Mittel zu einer Reduktion des Wachstums zwischen ~45% (3D7/CyRPA-I155A-3xHA) bis zu ~80% (3D7/CyRPA-E148A-3xHA)(Abbildung 21 A). Im direkten Vergleich mit der Kontroll-Linie, die lediglich eine Reduktion des Wachstums von ~25% aufwies, ist das

verminderte Wachstum von 3D7/CyRPA-I155A-3xHA als nicht signifikant anzusehen, was einhergeht mit den zuvor durchgeführten Bindungsstudien, bei denen die Affinität zur Bindung von Glykanen um das 20-fache geringer war (69). Die Reduktion des Wachstums der anderen 4 Linien weist eine statistische Signifikanz auf, wobei 3D7/CyRPA-E148A-3xHA als höchst signifikant eingestuft wird. Diese Werte stützen ebenfalls die Ergebnisse der Bindungsstudien, mit der Ausnahme von 3D7/CyRPA-I149A-3xHA bei der sich nur eine 10-fach verringerte Affinität zeigte.

Die beiden Linien, deren veränderte Aminosäuren innerhalb der ASP-Box lokalisiert sind, zeigen sogar beide ein signifikant reduziertes Wachstum von ~85% und ~54% im Vergleich mit der Kontroll-Linie (Abbildung 21 B).

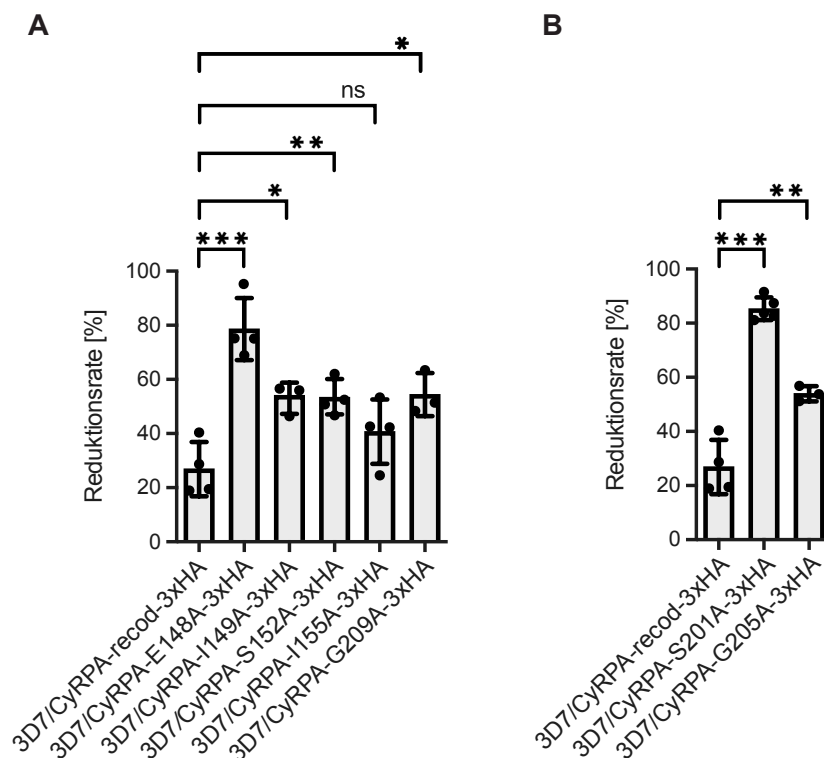


Abbildung 21 Die Expression der einzelnen CyRPAmut Varianten zeigt unterschiedlichen starken Effekt auf die Proliferation der transgenen Parasiten. (A) Reduktion der Proliferation nach drei Replikationszyklen von Rapalog behandelten Parasiten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Rapalog-induzierte Exzision führt außer bei 3D7/CyRPA-recod-3xHA zur Einführung einer Punktmutation innerhalb der Lektin-Bindestelle. (B) Reduktion der Proliferation nach drei Replikationszyklen von Rapalog behandelten Parasiten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Rapalog-induzierte Exzision führt außer bei 3D7/CyRPA-recod-3xHA zur Einführung einer Punktmutation innerhalb der ASP-Box. Dargestellt sind die Werte der unabhängigen Einzelmessungen ($n = 4$; 3D7/CyRPA-S201A-3xHA: $n = 5$; 3D7/CyRPA-G205A-3xHA: $n = 3$), Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikanz wurde überprüft mit ungepaartem t-test (two-tailed; $*p < 0,05$).

Um eventuelle nicht den Invasionsprozess betreffende Effekte auf die Proliferation auszuschließen, wurde die Invasion und der Egress in weiteren Experimenten im Detail untersucht.

Zur Bestimmung der Invasions-Effizienz wurde die Anzahl der neugebildeten Ringe pro ruptiertem Schizonten bestimmt und hierbei die Rapalog-induzierten mit der zugehörigen unbehandelten Kontrolle verglichen. Der Egress ließ sich durch die Abnahme der Schizonten-Parasitämie innerhalb eines definierten Zeitraums quantifizieren.

Die Kontroll-Linie zeigte wie erwartet keinen signifikanten Unterschied, sowohl im Egress als auch bei der Reinvansion (Abbildung 22 A). Ebenso konnte beim Vergleich der CyRPA-Varianten bei keiner Linie ein verminderter Egress festgestellt werden (Abbildung 22, 9 und 10). Zudem lag der Egress im Mittel bei allen Linien zwischen ~72% und ~95% was ebenfalls auf keinen Defekt während des Egress hinweist (Abbildung 22, 9 und 10).

Für 3D7/CyRPA-E148-A konnte trotz einer hohen Streuung der einzelnen Messwerte der unbehandelten Kontrolle ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, welches einer geringeren Invasionsrate von ~64% entspricht (Abbildung 22 B). Dies spiegelt die Daten des Wachstumsassays wider bei dem eine Reduktion des Wachstums um ~80% nach 3 Zyklen gefunden wurde. Die Linien 3D7/CyRPA-I149A-3xHA (Abbildung 22 C), 3D7/CyRPA-S152A-3xHA (Abbildung 23 A) und 3D7/CyRPA-I155A-3xHA (Abbildung 23 B) zeigten keinen signifikanten Unterschied. Während dies für 3D7/CyRPA-I149A-3xHA und 3D7/CyRPA-I155A-3xHA den Erwartungen entsprach, steht es für 3D7/CyRPA-S152A-3xHA im Gegensatz zum signifikant reduzierten Wachstum von ~48% und einer 1000-fach niedrigeren Bindeaffinität. Allerdings liegt auch hier eine hohe Streuung der einzelnen Messpunkte vor. Die Linie 3D7/CyRPA-G209A-3xHA zeigt eine hohe Signifikanz beim Vergleich der Werte, was auf eine verminderte Invasions-Effizienz hinweist und ebenso mit den zuvor ermittelten Daten des Proliferationsassays übereinstimmt (Abbildung 23 C).

Somit lässt sich abschließend sagen, dass der Austausch der einzelnen Aminosäuren die *in vivo* Daten bestätigen, da ein vermindertes Wachstum festgestellt werden konnte, welches mit einer geringeren Invasions-Effizienz korreliert. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Modifikation der einzelnen prognostizierten Haupt-Interaktionspartner für die Bindeaktivität einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Funktionalität von CyRPA während der Ausbildung des RH5-CyRPA-Ripr-Komplexes und die initiale Bindung an die Erythrozytenoberfläche hat.

Auch für die beiden Linien deren Modifikationen in der ASP-Box liegen, konnte für beide ein signifikanter Unterschied (Abbildung 24 A+B) von einer um ~74% und einer um

~62% verringerten Invasionsrate gezeigt werden, was ebenfalls mit den signifikanten Werten des verminderten Wachstums einhergeht.

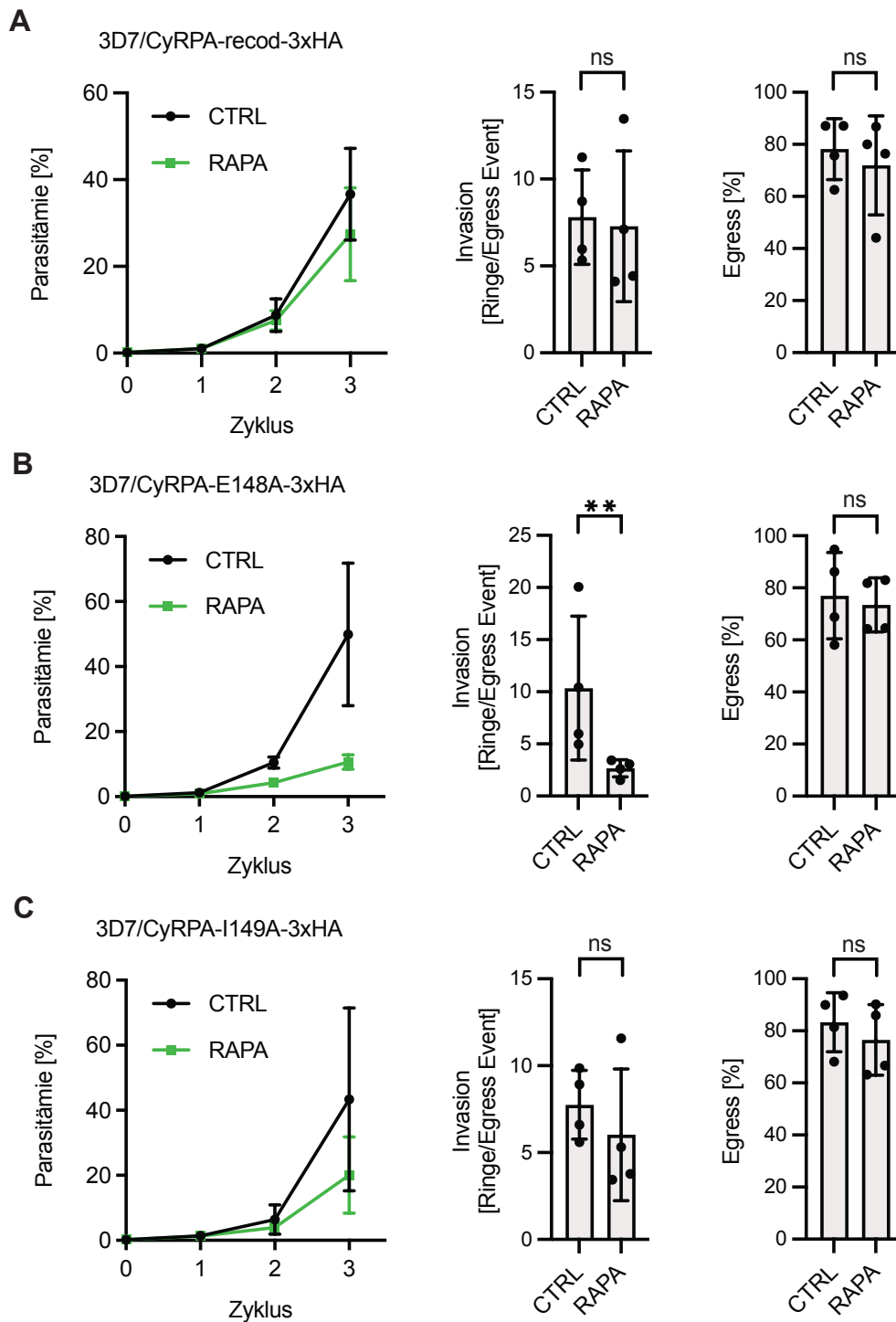


Abbildung 22 Charakterisierung des Einflusses der Punktmutation innerhalb der putativen Lektin-Bindestelle auf das Wachstum der Parasiten. (A) Zunahme der Parasitämie (Mittelwert aus min. drei Einzelmessungen und \pm Standardabweichung) pro Zyklus und Vergleich der Invasions- und Egressraten von Rapalog behandelten (RAPA) und unbehandelten (CTRL) 3D7/CyRPA-recod-3xHA Parasiten. (B) Zunahme der Parasitämie (Mittelwert aus min. drei Einzelmessungen und \pm Standardabweichung) pro Zyklus und Vergleich der Invasions- und Egressraten von Rapalog behandelten (RAPA) und unbehandelten (CTRL) 3D7/CyRPA-E148A-3xHA Parasiten. (C) Zunahme der

Parasitämie (Mittelwert aus min. drei Einzelmessungen und \pm Standardabweichung) pro Zyklus und Vergleich der Invasions- und Egressraten von Rapalog behandelten (RAPA) und unbehandelten (CTRL) 3D7/CyRPA-I149A-3xHA Parasiten. Invasion und Egress wurden durch Auszählen von ≥ 4500 infizierten und uninfizierten Erythrozyten auf Giemsa-gefärbten Ausstrichen pro Zeitpunkt bestimmt. Signifikanzanalyse der vier unabhängigen Experimente wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; $*p>0,05$) durchgeführt (A-C).

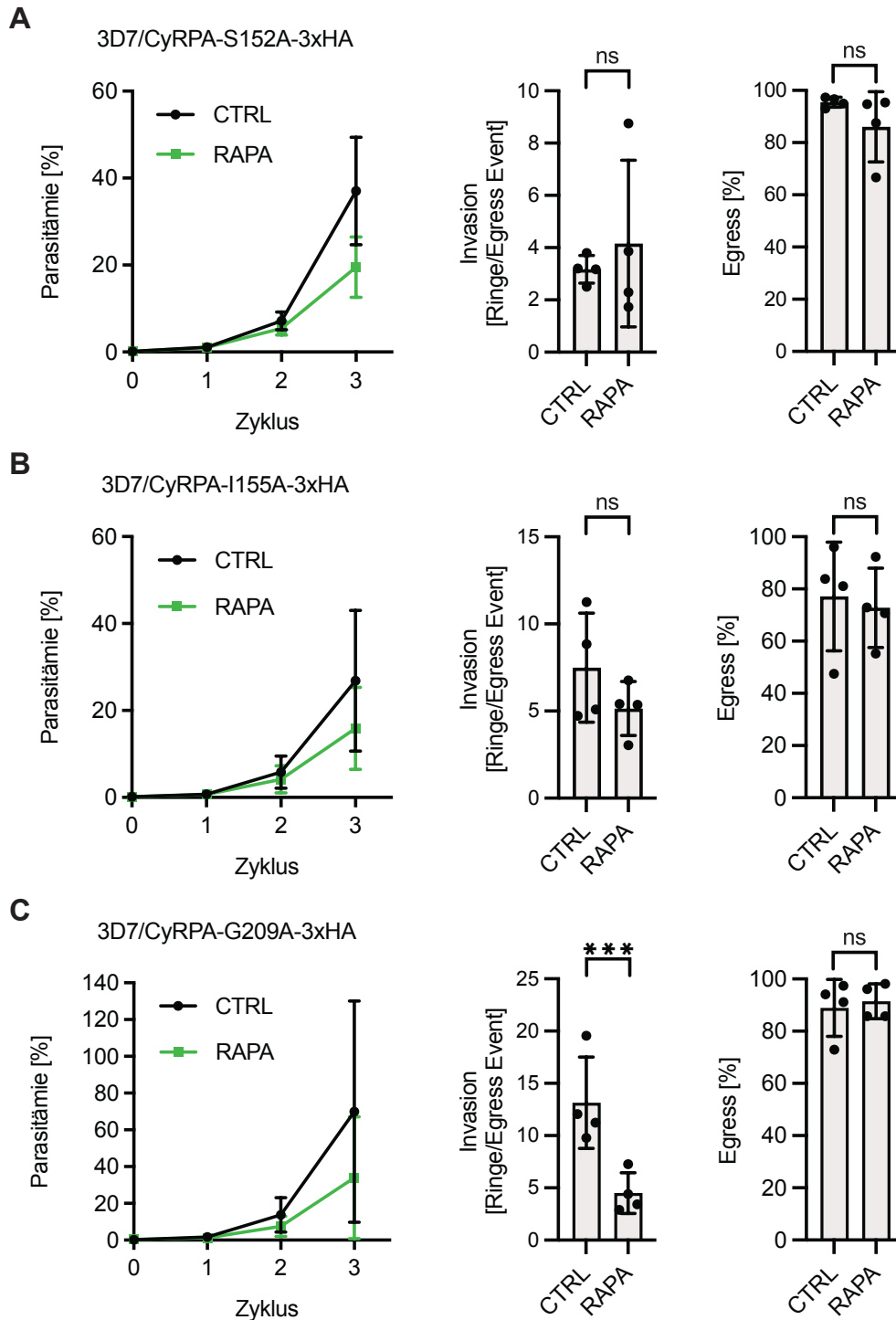


Abbildung 23 Charakterisierung des Einflusses der Punktmutation innerhalb der putativen Lektin-Bindestelle auf das Wachstum der Parasiten. (A) Zunahme der Parasitämie (Mittelwert aus min. drei Einzelmessungen und \pm Standardabweichung) pro Zyklus und Vergleich der Invasions- und Egressraten von Rapalog behandelten (RAPA) und unbehandelten (CTRL) 3D7/CyRPA-S152A-3xHA

Parasiten. (B) Zunahme der Parasitämie (Mittelwert aus min. drei Einzelmessungen und \pm Standardabweichung) pro Zyklus und Vergleich der Invasions- und Egressraten von Rapalog behandelten (RAPA) und unbehandelten (CTRL) 3D7/CyRPA-I155A-3xHA Parasiten. (C) Zunahme der Parasitämie (Mittelwert aus min. drei Einzelmessungen und \pm Standardabweichung) pro Zyklus und Vergleich der Invasions- und Egressraten von Rapalog behandelten (RAPA) und unbehandelten (CTRL) 3D7/CyRPA-G209A-3xHA Parasiten. Invasion und Egress wurden durch Auszählen von ≥ 4500 infizierten und uninfizierten Erythrozyten auf Giemsa-gefärbten Ausstrichen pro Zeitpunkt bestimmt. Signifikanzanalyse der vier unabhängigen Experimente wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; $*p>0,05$) ermittelt (A-C).

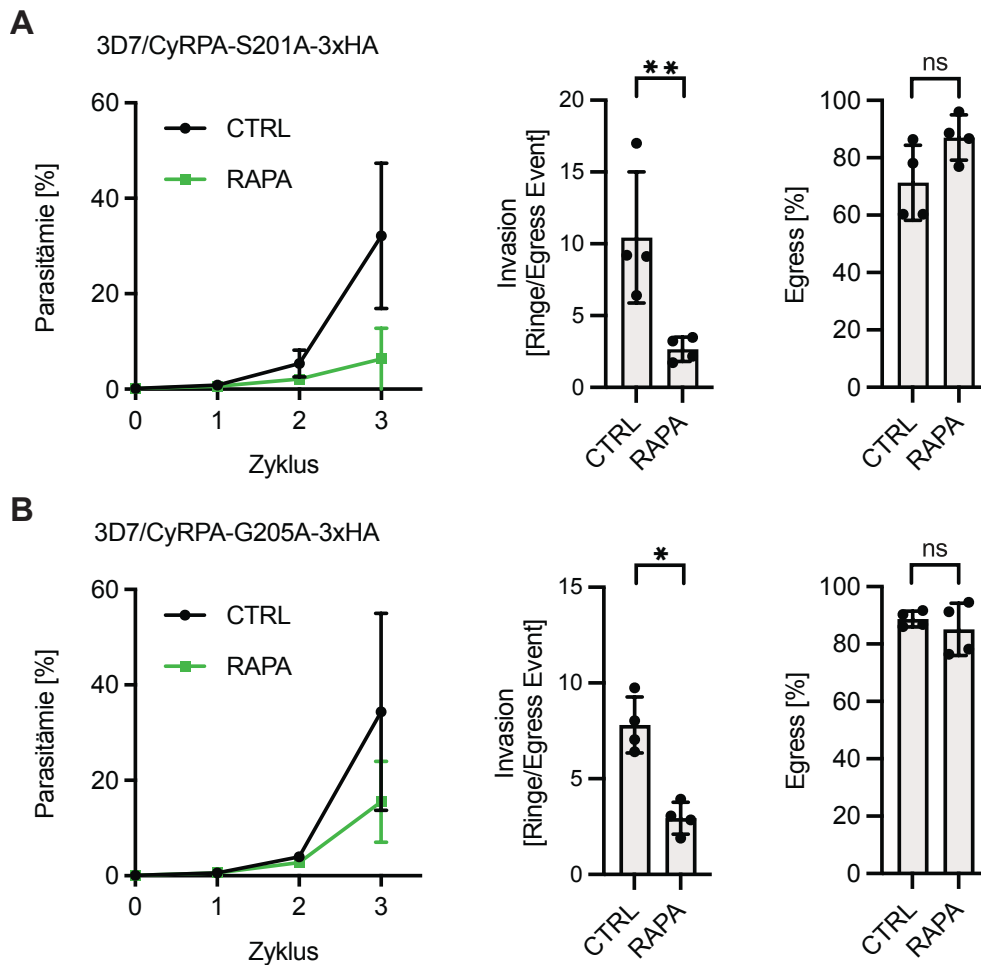


Abbildung 24 Charakterisierung des Einflusses der Punktmutation innerhalb der putativen ASP-Box auf das Wachstum der Parasiten. (A) Zunahme der Parasitämie (Mittelwert aus min. drei Einzelmessungen und \pm Standardabweichung) pro Zyklus und Vergleich der Invasions- und Egressraten von Rapalog behandelten (RAPA) und unbehandelten (CTRL) 3D7/CyRPA-S201A-3xHA Parasiten. (B) Zunahme der Parasitämie (Mittelwert aus min. drei Einzelmessungen und \pm Standardabweichung) pro Zyklus und Vergleich der Invasions- und Egressraten von Rapalog behandelten (RAPA) und unbehandelten (CTRL) 3D7/CyRPA-G205A-3xHA Parasiten. Invasion und Egress wurden durch Auszählen von ≥ 4500 infizierten und uninfizierten Erythrozyten auf Giemsa-gefärbten Ausstrichen pro Zeitpunkt bestimmt. Signifikanzanalyse der vier unabhängigen Experimente wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; $*p>0,05$) ermittelt (A+B).

3.1.6 Der Austausch der Aminosäure E148 zeigt keinen eindeutigen Einfluss auf die Bindung von Glykanen an der Oberfläche von Erythrozyten *in vivo*

Da der Austausch der Glutaminsäure (E148) gegen Alanin scheinbar den größten Effekt auf die Fitness des Parasiten hat und auch schon in Glykan-Bindestudien mit rekombinant exprimierten CyRPA-E148A keine Bindung mit humanem α -2,6-SLN-Ac und α -2,6-Biant-Ac nachgewiesen werden konnte, sollte mittels IFAs überprüft werden, ob der Parasit *in vivo* auch die Fähigkeit zur Bindung von Glykanen mit endständig gebundenen Neuraminsäuren verloren hat.

Um eine Detektion der gebundenen Glykane zu ermöglichen, wurden synthetische biotinylierte polymere N-Acetylneuraminsäuren (α -2,6-Biant-Ac (0997-BP)) eingesetzt. Außerdem sollte überprüft werden, ob es einen Unterschied zwischen humaner N-Acetylneuraminsäure (α -2,6-Biant-Ac) und der in Primaten zusätzlich vorkommenden N-Glycolylneuraminsäure (α -2,6-Biant-Gc) gibt, welches ebenfalls als biotinyliertes Polymer (0957-BP) eingesetzt wurde.

In Abbildung 25 und Abbildung 26 sind die Ergebnisse für die Kontroll-Linie und 3D7/CyRPA-E148-A Linie dargestellt. Beim Vergleich lässt sich sowohl für die CyRPA-WT exprimierenden Linien (3D7/CyRPA-recod-3xHA CTRL und RAPA und 3D7/CyRPA-E148-A CTRL) als auch die CyRPA-E148A exprimierende Linie (3D7/CyRPA-E148-A RAPA) kein gleichmäßiges Verteilungsmuster des 0997-BP erkennen. Ebenso ist weder für 3D7/CyRPA-recod-3xHA noch für 3D7/CyRPA-E148-A eine Co-Lokalisation des HA und des 0997-BP Signals zu sehen, was gegen eine spezifische Bindung des Glykans an CyRPA spricht.

Im Gegensatz dazu erscheint das Signal des 0957-BP wider Erwarten weniger diffus, sondern zeigt ein schwaches punktiertes Muster in CyRPA-WT exprimierenden Parasiten, was allerdings nicht mit dem HA-Signal co-lokalisiert. Für CyRPA-E148A ist ein Verteilungsmuster des 0957-BP vergleichbar zu der 0997-BP Verteilung erkennbar, welches ebenfalls keine Co-Lokalisation mit dem HA-Signal aufweist.

Zusammengefasst lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht sagen, ob CyRPA im Parasiten überhaupt das synthetische Glykan bindet bzw. ob es die Fähigkeit durch die Mutation verliert. Dies wird noch von den Ergebnissen für das nicht-humane Glykan bestärkt.

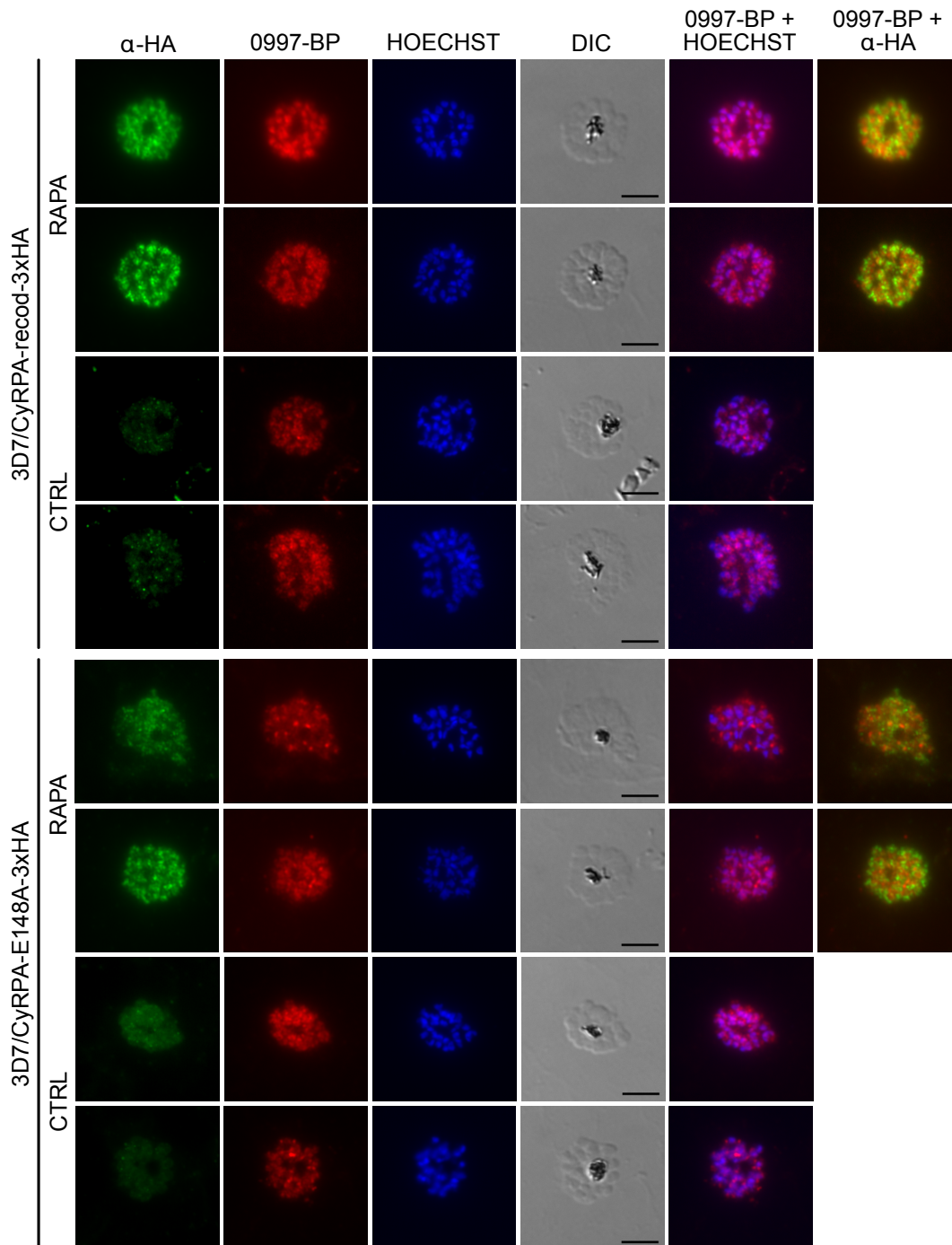


Abbildung 25 Bindung von Neu5Ac an CyRPA-E148A exprimierende Parasiten. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Schizonten Rapalog behandelter (RAPA) und unbehandelter (CTRL) 3D7/CyRPA-recod-3xHA und 3D7/CyRPA-E148A-3xHA Parasiten. CyRPA wurde mit α -HA (grün) und Neu5Ac (0997-BP) mit Streptavidin (rot) detektiert. Die Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt (blau). Maßstab= 5 μ m.

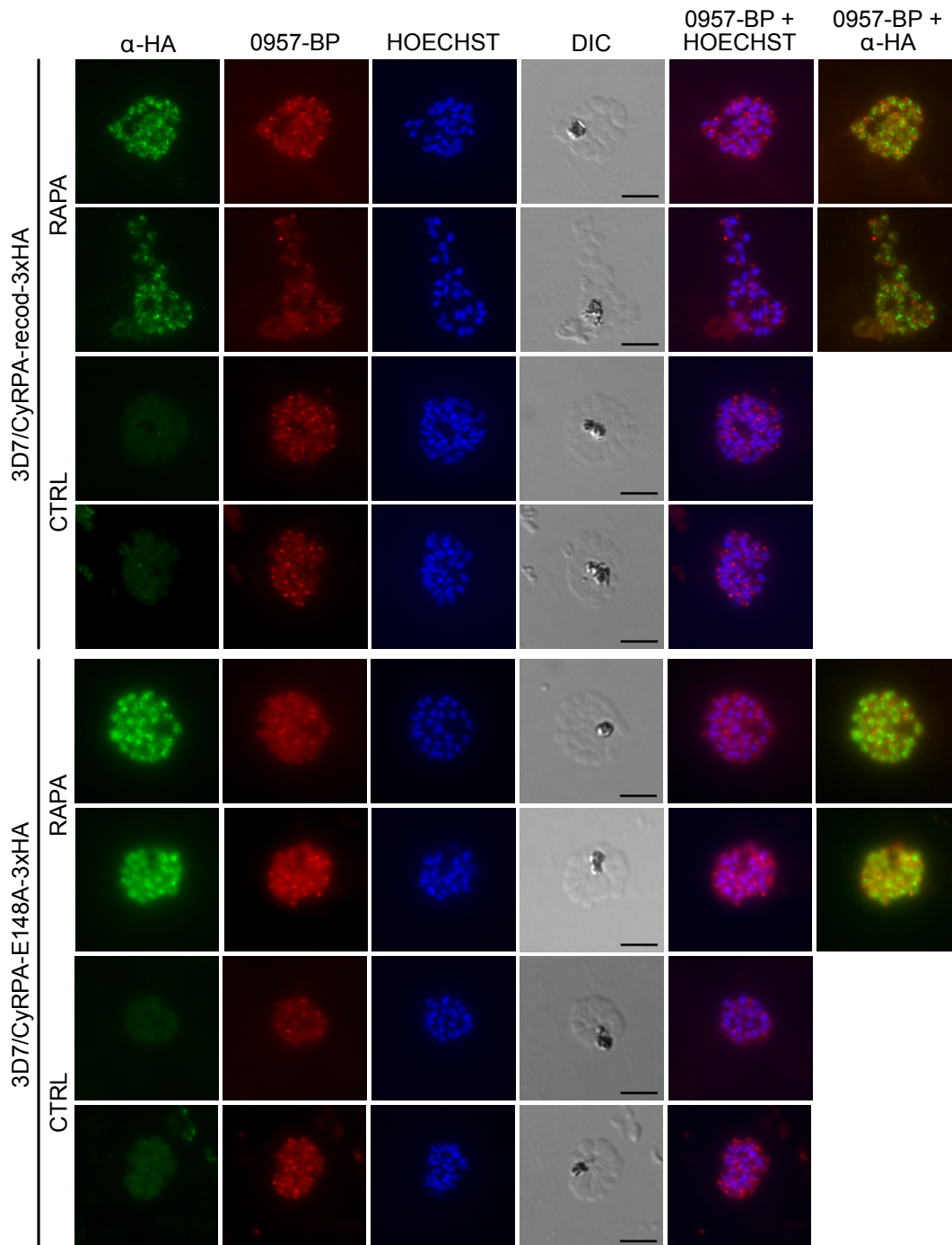


Abbildung 26 Bindung von Neu5Gc an CyRPA-E148A exprimierende Parasiten. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Schizonten Rapalog behandelter (RAPA) und unbehandelter (CTRL) 3D7/CyRPA-recod-3xHA und 3D7/CyRPA-E148A-3xHA Parasiten. CyRPA wurde mit α -HA (grün) und Neu5Gc (0957-BP) mit Streptavidin (rot) detektiert. Die Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt (blau). Maßstab= 5 μ m.

3.2 Die Rolle der beiden DBLMSP Proteine während der Entwicklung des Parasiten

3.2.1 DBLMSP2 ist an der Oberfläche von Merozoiten lokalisiert

In vorangegangenen Studien wurde die Lokalisation von DBLMSP2 an der Merozoiten-Oberfläche indirekt über DBLMSP2-spezifische Antikörper nachgewiesen (134). Um die Lokalisation von DBLMSP2 zu validieren und einen Zusammenhang zwischen der Expression von DBLMSP2 und sexueller Determination von Parasiten zu untersuchen, wurde am 3'Ende des *dblmsp2* Locus eine *mScarlet* codierende Sequenz eingefügt, die zur Expression eines DBLMSP2-mScarlet Fusionsproteins führt. Ein Vorteil einer Zelllinie, die ein fluoreszierendes Fusionsprotein exprimiert gegenüber der Nutzung von Protein-spezifischen Antikörpern ist neben der Möglichkeit zur Lebendzellmikroskopie, das fälschliche Detektion von Proteinen, die durch unspezifische Bindung von AK erkannt werden, ausgeschlossen werden kann. Dies ist vor allem wichtig, da für spezifische AK eine Kreuzreaktivität innerhalb der Familie MSP3-ähnlichen Proteine gezeigt werden konnte (253).

Zu diesem Zweck wurde die Sequenz zur Codierung einer geeigneten gRNA in das CRISPR Plasmid pY-gC (132) eingefügt. In ein zweites Donorplasmid wurden zur Reparatur des Doppelstrangbruchs im Ziel-Locus, die notwendigen beiden homologen Regionen in deren Mitte die *mScarlet* codierende Sequenz eingebettet lag, kloniert (Abbildung 27 A). Die beiden Plasmide wurden in synchrone 3D7 und 3D7-iGP Ring Kulturen co-transfiziert. Um für die folgenden Experimente Linien, die aus einem Einzelklon hervorgegangen sind, zu kultivieren, wurde das Protokoll für die limitierende Verdünnung angewendet (278). Die korrekte Integration des *dblmsp2-mScarlet* Konstrukt im Genom wurde mittels PCR überprüft und bestätigt (Abbildung 27 B+C).

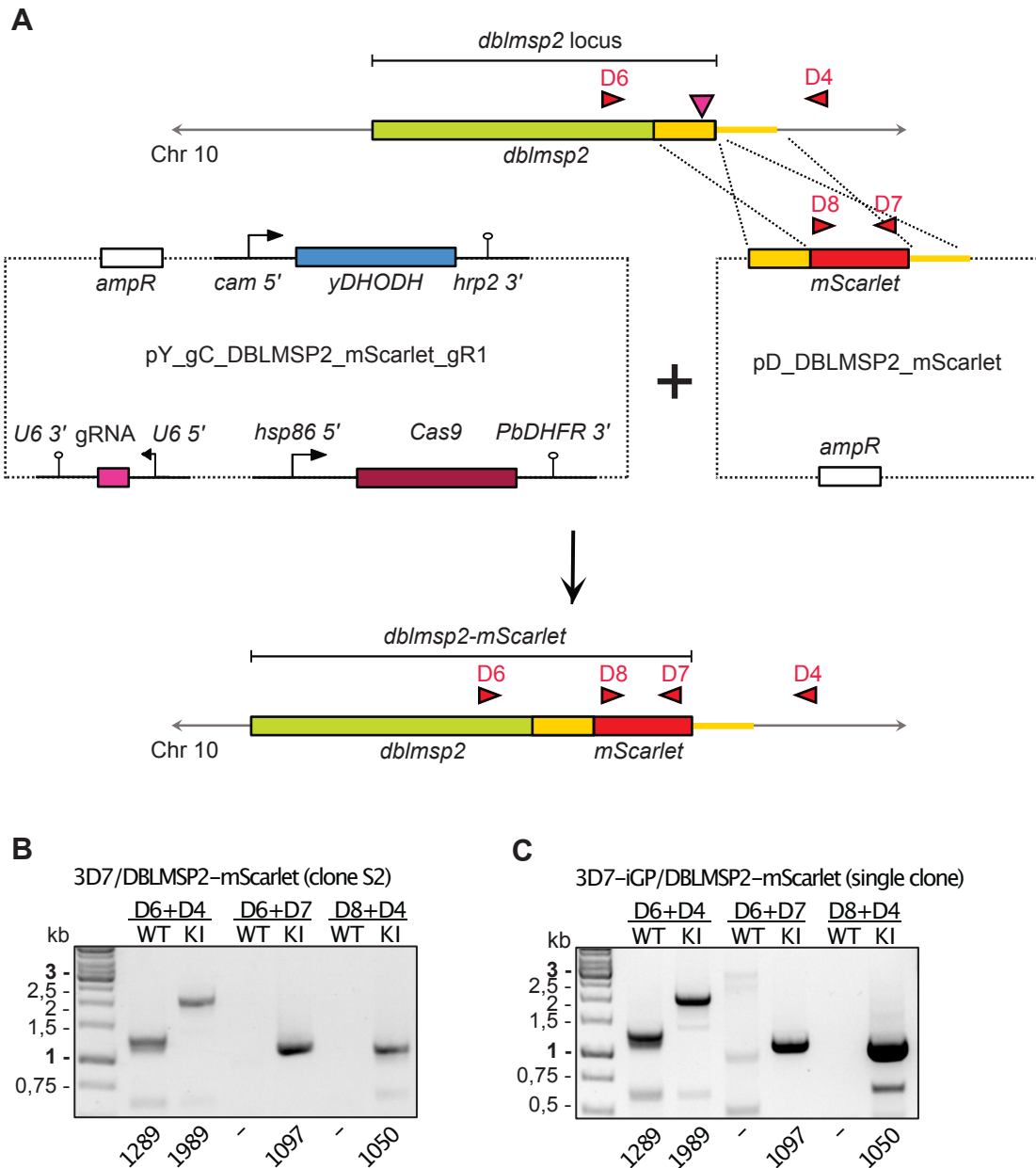


Abbildung 27 Generieren von transgenen DBLMSP2-mScarlet exprimierenden Parasiten Linien.

(A) Schema zur Integration des mScarlet-Tags (rot) am 3' Ende des *dblmsp2* Locus (hellgrün). Die Erkennungsstelle (pinkes Dreieck) der gRNA befindet sich innerhalb der homologen Bereiche (gelb) nahe des 3' Ende des Ziellocus. (B) und (C) Integrations-PCRs der transgenen Parasitenlinien zur Kontrolle der erfolgreichen Integration in das Parasitengenom. Bindestellen der verwendeten Primer sind im Schema in (A) dargestellt (rote Dreiecke).

Als nächstes wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation und Expression von DBLMSP2 untersucht. Erwartungsgemäß konnte ein mScarlet-Signal erst im späten Schizonten Stadium detektiert werden. Wie in den Abbildungen deutlich zu sehen ist, zeigte das mScarlet-Signal ein ringförmiges Muster, welches typisch für eine Lokalisation an der Merozoiten-Oberfläche ist und die schon vorher publizierte Lokalisation bestätigt (Abbildung 28). Außerdem konnte nur eine geringe Anzahl von mScarlet exprimierenden Schizonten in der Parasitenpopulation festgestellt werden,

sowohl in Parasiten die aus der parentalen 3D7 als auch der 3D7-iGP Linie hervorgegangen waren. Da es sich um klonale Parasitenlinien handelte, die potenziell alle DBLMSP2 exprimieren könnten, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass DBLMSP2 nur in einer Subpopulation aller Schizonten exprimiert wird. Dieses Ergebnis geht einher mit den zuvor publizierten Transkriptomanalysen die zeigten, das DBLMSP2 zusammen mit AP2-G und anderen mit der sexuellen Entwicklung im Zusammenhang stehenden Genen reguliert wird (103).

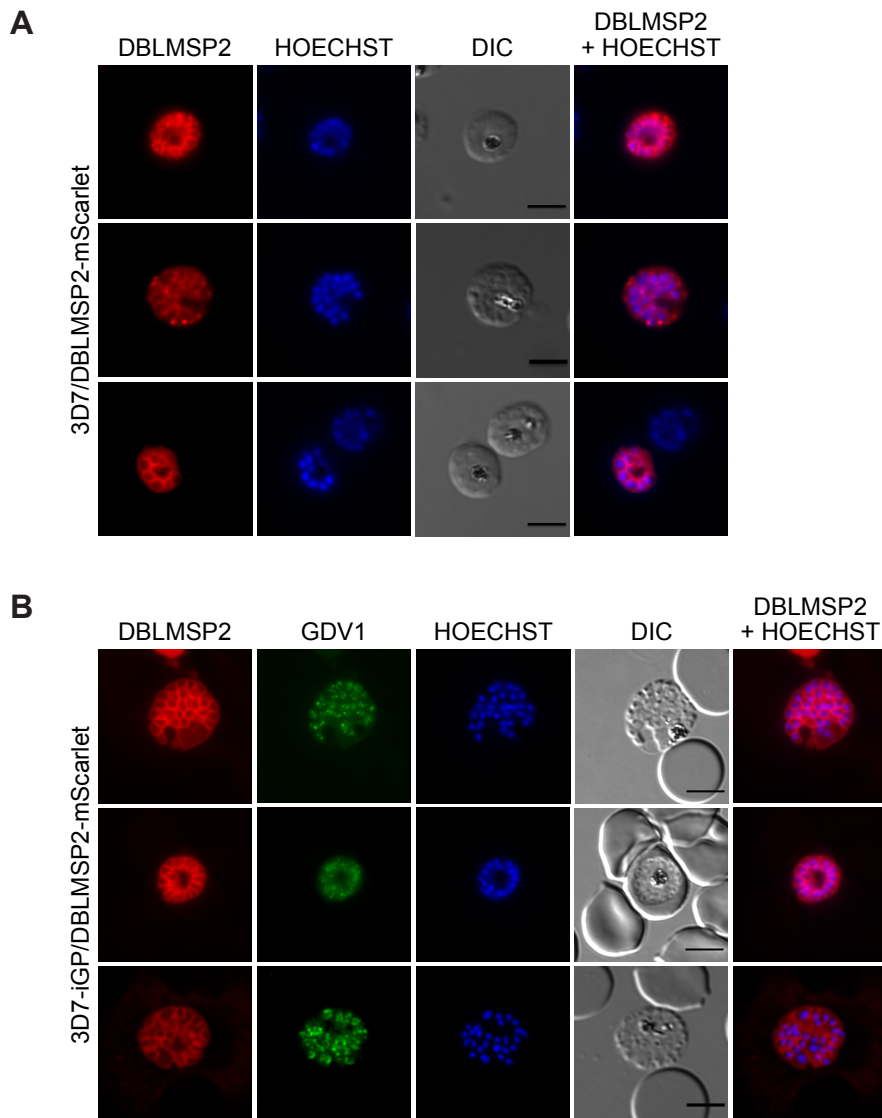


Abbildung 28 Lokalisation von DBLMSP2 an der Oberfläche von Merozoiten. (A) Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie von C2 behandelten 3D7/DBLMSP2-mScarlet Schizonten. Die Lokalisierung von DBLMSP2 wird durch die Expression des fluoreszierenden Fusionsproteins DBLMSP2-mScarlet ermöglicht. (B) Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie von C2 und Shield-1 behandelten 3D7-iGP/DBLMSP2-mScarlet Parasiten. Neben dem DBLMSP2-mScarlet Fusionsproteins, exprimieren diese Parasiten durch die Gabe von Shield-1 GDV1-GFP-DD, welches in 3D7-iGP Parasiten im cg6 Locus integriert ist. Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt. Maßstab= 5 μ m.

3.2.2 Bei DBLMSP2 handelt es sich um ein für asexuelle Proliferation nicht-essentielles Protein

Um einen möglichen Effekt von DBLMSP2 auf die asexuelle Entwicklung von *P. falciparum* festzustellen, wurde reverse Genetik in Form eines funktionalen Knockouts des *dblmsp2* Gens in 3D7 Parasiten angewendet. Um die Modifikation in das Genom einbringen zu können, wurde das pCRISPR-Cas_KO_only Plasmid als Grundlage genommen und über Gibson Assembly, mit zwei homologen Regionen des 5' und 3' Ende des *dblmsp2* Locus und einer DSM1-Resistenz codierenden *yDHODH*-Kassette ergänzt. Da sich auf dem Plasmid neben der gRNA auch die Sequenz der Cas9 befinden, wurde das Plasmid über Single-Transfektion in die beiden Parasiten Linien eingebracht (Abbildung 29 A). Nach der Transfektion wurde durch die Gabe von DSM1 auf positive Integranten selektiert. Anschließend wurden die Transfektanten auskloniert um WT-freie DBLMSP2-KO Linien zu erhalten. Die korrekte Integration im Genom wurde mittel PCR bestätigt (Abbildung 29 B).

In einem Wachstumsassay wurde anschließend die Proliferation des DBLMSP2-defizienten Klons K4 im Vergleich zu WT-Parasiten überprüft (Abbildung 29 C). Es konnte über die Dauer von zwei Zyklen kein signifikanter Unterschied in der Zunahme der Anzahl der Parasiten festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass die Expression von DBLMSP2 für den Parasiten während der Schizogonie und der anschließenden Reinvasion nicht überlebenswichtig ist. Dieses Ergebnis unterstützt die Ergebnisse des PiggyBac Screens (320).

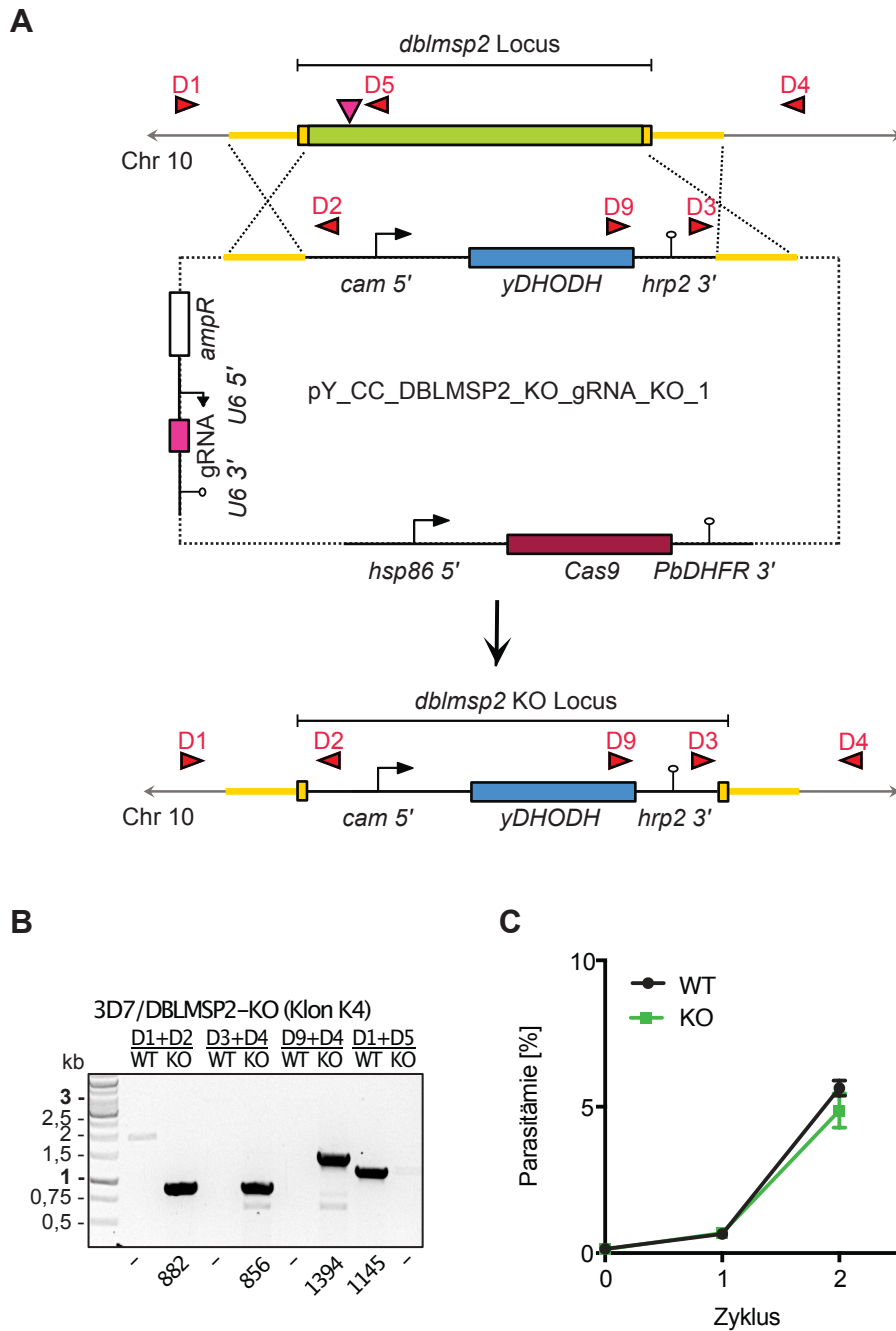


Abbildung 29 Generieren von transgenen 3D7 Parasiten mit einem funktionalen DBLMSP2-KO.

(A) Schema zur Integration der DSM1-Resistenzkassette innerhalb des *dblmsp2* Locus (hellgrün) um einen funktionalen KO des Gens zu erreichen. Über das CRISPR/Cas9-KO Plasmid wird die DSM1-Resistenzkassette in den Bereich zwischen die Beiden homologen Bereiche (gelb) eingefügt. Die Erkennungsstelle (pinkes Dreieck) der gRNA befindet sich außerhalb der homologen Bereiche (gelb) nahe des 3' Ende des Ziellocus. (B) Integrations-PCRs der transgenen Parasitenlinie zur Kontrolle der erfolgreichen Modifikation des Ziellocus. Bindestellen der verwendeten Primer sind im Schema in (A) dargestellt (rote Dreiecke). (C) Wachstumskurve über zwei Zyklen. Gemessen wurde die Zunahme der Parasitämie von 3D7 (WT) und 3D7/DBLMSP2-KO (KO) mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

3.2.3 Der Verlust von DBLMSP2 hat keinen relevanten Einfluss auf die Gametozyten Entwicklung und die sexuelle Konversion

Während des asexuellen Entwicklungs-Zyklus konnte kein Einfluss von DBLMSP2 auf die Proliferation des Parasiten nachgewiesen werden. Daher sollte im nächsten Schritt ein eventueller Einfluss, während der Gametozyten-Entwicklung überprüft werden. Um eine höhere Anzahl an sich sexuell differenzierenden Parasiten zu erhalten, wurde analog zu dem KO in der 3D7 Linie eine weiterer KO in der 3D7-iGP Linie erzeugt (Abbildung 30 A). Parasiten der 3D7-iGP Linie haben eine zusätzliche Modifikation im *cg6* Locus, die eine gezielte Überexpression von GDV1 und somit eine gezielte Induktion der sexuellen Determinierung ermöglicht. Über CRISPR/Cas vermittelte Insertion, wurde hier eine dem *cam*-Promotor unterliegende Expressionskassette, die zur Expression eines Fusionsproteins aus GDV1, GFP und einer destabilisierenden FKBP-Domäne (DD) eingeführt (32). Die Domäne am 3' Ende des Proteins, führt zu einer Destabilisierung und einem darauffolgenden Abbau des Proteins, welche durch die Zugabe des Liganden Shield-1 unterbunden werden kann und GDV1-GFP-DD behält seine Aktivität (14, 32). Auch bei Parasiten, die nicht über diese Modifikation verfügen, lassen sich die Konversionsraten beeinflussen. Hierbei macht man sich zu Nutze, das die Parasiten sensibel auf äußere Einflüsse reagieren, und die Konzentration von Lysophosphatidyl-Cholin (Lyso-PC) im Medium sexuelle Determinierung unterdrücken bzw. auslösen kann (36).

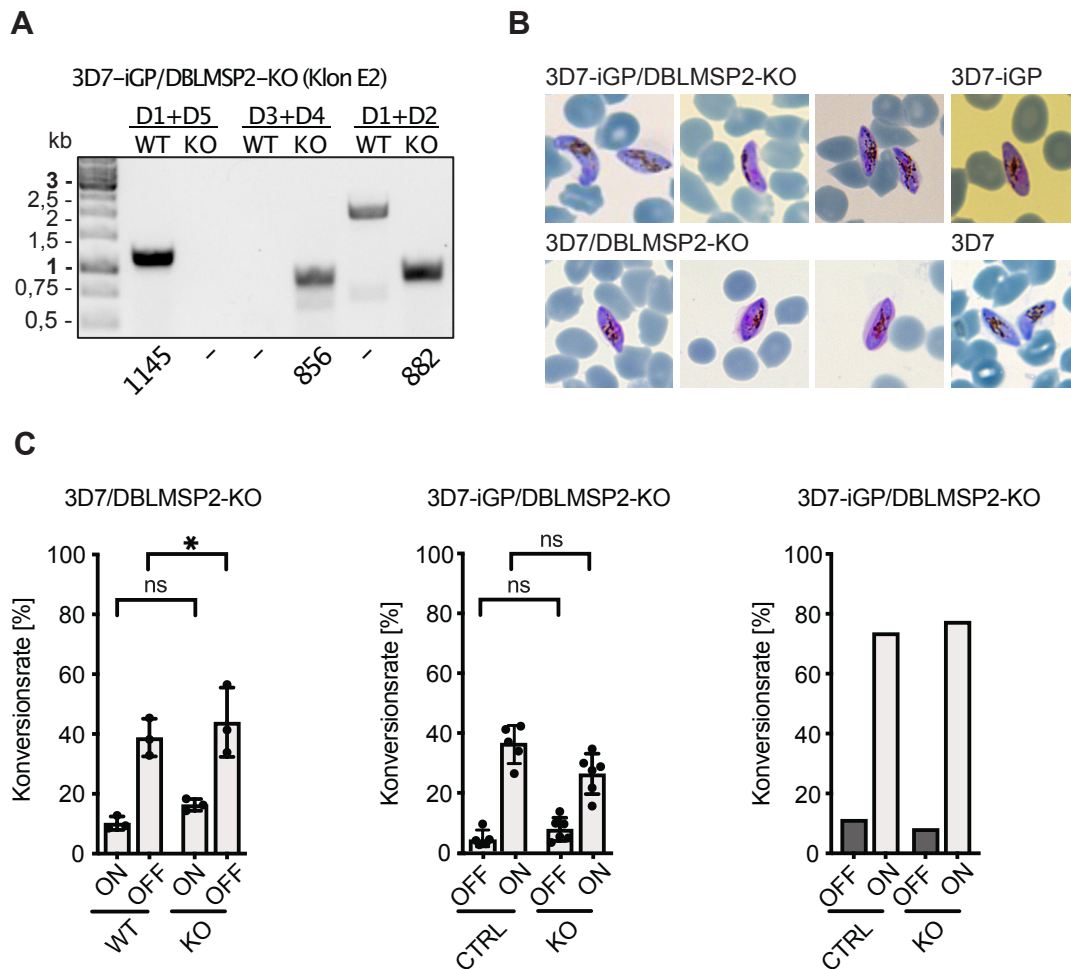


Abbildung 30 Einfluss des DBLMSP2-KO auf die sexuelle Differenzierung zu Gametozyten.

(A) Integrations-PCRs der transgenen Parasitenlinie zur Kontrolle der erfolgreichen Modifikation des Ziellocus. Bindestellen der verwendeten Primer sind im Schema in Abbildung 3 A) dargestellt (rote Dreiecke). (B) Giemsa-gefärbte Blutaussstriche von Stadium IV/V Gametozyten (Tag 10 nach der Reinvasion) (C) Sexuelle Konversionsraten der DBLMSP2-KO Linien im Vergleich zu den Kontrolllinien. Links und Mitte: Konversionsraten wurden als Quotient der Anzahl von Parasiten von Tag 7 und Tag 2 nach der Reinvasion anhand von Giemsa-gefärbten Ausstrichen bestimmt. Die dargestellten Daten entsprechen min. drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzanalyse wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; $*p > 0,05$) durchgeführt. Rechts: Konversionsraten wurden mit Hilfe von IFA bestimmt. Hierfür wurde bei Methanol-fixierten Parasiten (38-46 hpi) sexuell determinierte Parasiten mit *a*-Pfs16 AK detektiert und die Nuclei mit Hoechst angefärbt. Konversionsraten wurden aus dem Quotienten der Anzahl von Hoechst/Pfs16 positiven und Hoechst positiven Parasiten bestimmt.

Parasiten beider DBLMSP2-KO tragenden Linien wurden jetzt hingehend ihrer Fähigkeit viable maturierte Gametozyten zu bilden untersucht, wobei zum einen die Entwicklung bis zum Stadium V dokumentiert und zum anderen die sexuellen Konversionsraten bestimmt wurden.

Zur Bestimmung der sexuellen Konversionsraten wurden „Commitment“-Assays durchgeführt, hierbei wurde Parasiten mit 3D7-iGP Hintergrund Shield-1 zur Stabilisierung des im *cg6* Locus codierten GDV1 zum Medium gegeben. Bei Parasiten mit

3D7 Hintergrund wurde die Konzentration von Cholin im Medium verringert und infolgedessen eine erhöhte Expression des endogenen GDV1 erreicht. In beiden Fällen wurde so eine Induktion der sexuellen Konversion erreicht. Die anhand von Bildern Giemsa-gefärbter Blutaussstrichen bestimmten Konversionsraten wurden für beide Linien jeweils mit unter Normalbedingungen kultivierten Parasiten verglichen.

Sowohl in den Kulturen der 3D7-iGP als auch der 3D7 Parasiten konnten an Tag 10 nach der Reinvansion morphologisch normal aussehende Gametozyten, gleichermaßen bei parentalen Linien als auch bei KO-Linien gefunden werden (Abbildung 30 B).

Nach der Induktion zur sexuellen Konversion konnte ein gering signifikanter Unterschied der Raten bei geringer Cholin Konzentration festgestellt werden. Diese lag im Mittel zwischen ~ 39% (3D7-WT) und ~ 44% (3D7/DBLMSP2-KO) (Abbildung 30 C). Hierbei ist aber zu beachten, dass dieser Unterschied nicht zwingend durch das Fehlen von DBLMSP2 verursacht sein muss, sondern andere unbekannte äußere Faktoren der Grund sein können. Ein Hinweis hierauf ist auch die höhere Varianz der Einzelwerte, die nicht im gleichen Maße in Anwesenheit von Cholin zu finden ist (Abbildung 30 C). Es konnte hier auch kein Unterschied in der dauerhaft stattfindenden Hintergrund-Konversion nachgewiesen werden. Ebenfalls stimmten die Werte in etwa mit den in der Literatur zu findenden Werten überein (36).

Eine Möglichkeit, den Effekt der unspezifischen äußeren Faktoren zu verringern, ist die gezielte Aktivierung der Expression von AP2-G mittels der induzierten Überexpression von GDV1 (103). Deshalb wurden die Konversionsraten erneut für die 3D7-iGP Linien bestimmt indem durch die Gabe von Shield-1 die Überexpression von GDV1 und die darauffolgende sexuelle Konversion induziert wurde. Die Auswertung der 3D7-iGP zeigte vergleichbare Ergebnisse bei 3D7-iGP und 3D7-iGP/DBLMSP2-KO, allerdings lagen die ermittelten Werte etwas unterhalb der erwarteten und eher im Bereich (ON Shield-1: ~40% OFF Shield-1: ~3,8%) von 3D7 Parasiten, die kein GDV1 überexprimierten (Abbildung 30 C)(103). Da die Berechnung der zugrunde liegenden Zahlen von Gametozyten an Tag 2 und Tag 7 nach der Reinvansion erfolgten, wurde zusätzlich ein Assay durchgeführt, bei dem über eine IFA das Pfs16 detektiert wurde. Pfs16 wird als Gametozyten-spezifischer Marker genutzt (39) und über das Verhältnis von Pfs16-positiven und -negativen Parasiten an Tag 2 konnte das Commitment kalkuliert werden. Auch hier waren die Werte von 3D7-iGP und 3D7-iGP/DBLMSP2-KO miteinander vergleichbar, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Shield-1, außerdem lagen die Werte von etwa 11% und knapp 74% bei den zuvor für die 3D7-iGP publizierten Werten (Abbildung 30 C; Bilder im Anhang)(32).

Auf Basis dieser Daten, lässt sich nun vermuten, dass die Expression von DBLMSP2 keinen direkten Einfluss auf die Differenzierung zu Gametozyten und außerdem auch

keinen Einfluss auf die Konversionsraten hat. Anhand dieser Daten kann allerdings keine endgültige Aussage über die Beteiligung von DBLMSP2 bei der Invasion von sexuell determinierten Ringen getroffen werden.

3.2.4 Die Anzahl DBLMSP2 exprimierender Schizonten ist trotz signifikant negativer Korrelation mit GDV1 exprimierenden Parasiten nach induzierter sexueller Konversion signifikant erhöht

Bei der Untersuchung verschiedener klinischer Isolate konnte nachgewiesen werden, dass mit erhöhten *dblmsp2* Transkript-Leveln auch eine höhere Anzahl von DBLMSP2-positiven Parasiten in den Kulturen zu finden ist ((133). Hierbei wurden die Proben in den meisten Fällen direkt nach dem Auftauen der Isolate genommen bzw. wurden sie für die Dauer von 10 Tagen kultiviert. Da nicht beschrieben wurde unter welchen Bedingungen kultiviert wurde, ist nicht klar ob unspezifische äußere Faktoren die Konversionsraten der einzelnen Isolate zusätzlich beeinflussten und somit einen zusätzlichen Effekt auf die erhobenen Daten haben könnten. Außerdem konnte in dieser Studie nicht eindeutig gezeigt werden, ob es eine Korrelation zwischen DBLMSP2-exprimierenden Schizonten und sexueller Entwicklung gibt.

Um diesen möglichen Zusammenhang eingehender zu prüfen, wurden in einer Kultur eng synchronisierte Schizonten der 3D7/DBLMSP2-mScarlet Linie sexuelle Konversion durch eine niedrige Konzentration von Cholin induziert. Diese wurden mit Parasiten verglichen, die unter Normalbedingungen kultiviert wurden. Um ein vollständiges Maturieren aller Parasiten zu späten Schizonten zu erreichen, wurde zu beiden Kulturen 8 h vor der Probenahme Compound 2 gegeben (17). Bevor die Anzahl der DBLMSP2-mScarlet exprimierenden Schizonten (im Folgenden als DBLMSP2⁺ bezeichnet) unter dem Mikroskop quantifiziert werden konnten, wurden sie in 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Aufgrund zuvor publizierter Daten (133) und der Vermutung, dass das Protein in sexuell determinierten Parasiten exprimiert wird, wurden bei Kultivierung unter Normalbedingungen nur ~1% DBLMSP2 exprimierende Parasiten erwartet, weshalb mindesten 1000 Schizonten pro Experiment und Linie gezählt wurden. Von den ausgezählten Schizonten waren im Mittel 1,7% in der Kontrolle DBLMSP2 positiv (DBLMSP2⁺) und 5%, wenn kein Cholin zum Medium zugegeben wurde (Abbildung 31A). Ein Einfluss auf die Konversion durch den mScarlet-tag am 3' Ende des DBLMSP2 wurde zuvor ausgeschlossen (Abbildung 31 C). Im Vergleich zu den Konversionsraten der 3D7 Parasiten von ungefähr 10% und 30% deutet dies auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von DBLMSP2 und sexueller Konversion hin.

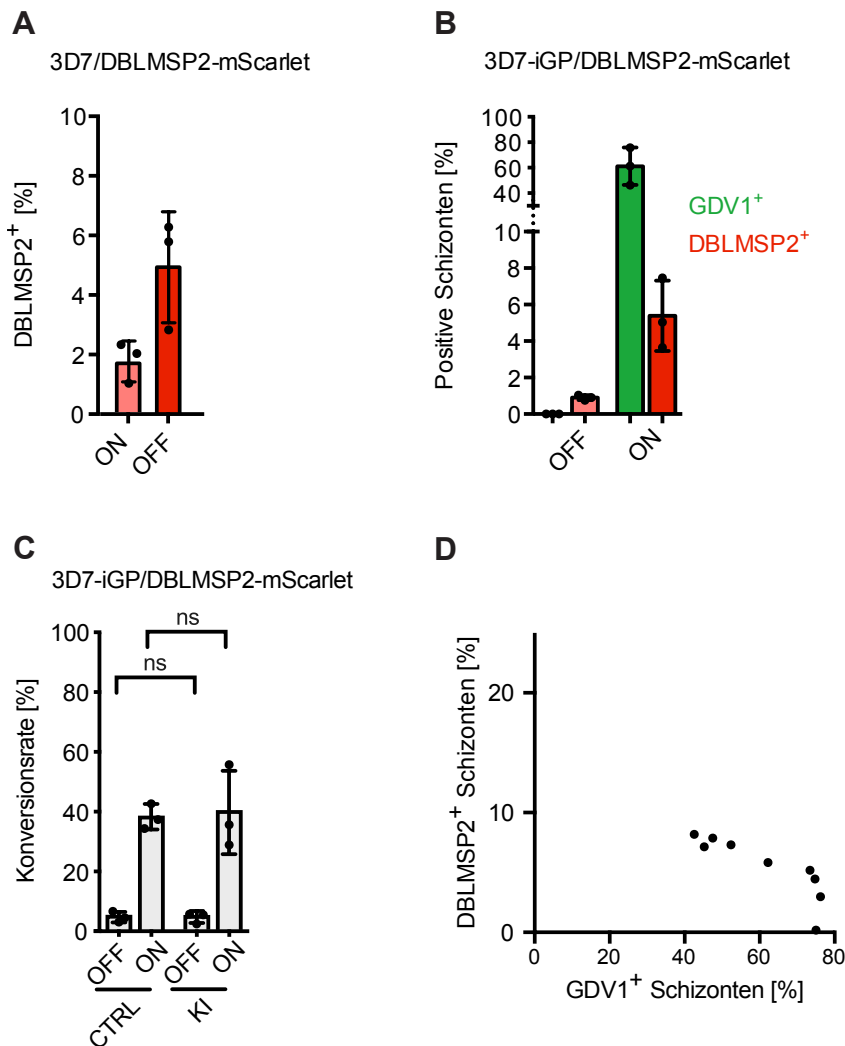


Abbildung 31 Korrelation zwischen DBLMSP2 und GDV1 Expression in sexuell determinierten Parasiten. (A) Vergleich des Anteils DBLMSP2-exprimierender Schizonten die in RPMI+Cholin (ON) bzw. RPMI (OFF) kultiviert wurden. (B) Anteile DBLMSP2- und GDV1-exprimierender Schizonten in Shield-1 behandelten (ON) und unbehandelten (OFF) Parasiten. (C) Vergleich der Konversionsraten von 3D7-iGP/DBLMSP2-mScarlet (KI) und 3D7-iGP (CTRL) Parasiten. Konversionsraten wurden als Quotient der Anzahl von Parasiten von Tag 7 und Tag 2 nach der Reinvasion anhand von Giemsa-gefärbten Ausstrichen bestimmt. Die dargestellten Daten entsprechen min. drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzanalyse wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; * $p > 0,05$) durchgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert inklusive \pm -Standardabweichung sowie die Werte der drei unabhängigen Einzelmessungen (A-C). (D) Darstellung von DBLMSP2⁺ in Abhängigkeit zu GDV1⁺ mit Shield-1 behandelten 3D7-iGP/DBLMSP2 Parasiten. Die einzelnen Datenpunkte stellen die Auszählung von drei unabhängigen in Triplikaten durchgeführten Experimenten dar.

Da gezeigt werden konnte, dass die Expression von DBLMSP2 durch die Konzentration von Cholin und der daraus folgenden Induktion von sexueller Konversion hoch reguliert wird, wurde ebenfalls der Einfluss der induzierten Expression von GDV1 untersucht und ob eine direkte Korrelation zu finden ist.

Dafür wurde eine eng synchronisierte Kultur von 3D7-iGP/DBLMSP2-mScarlet Parasiten

mit einer Parasitämie von etwa 5% in zwei Hälften geteilt. Eine der beiden Kulturen wurde mit Shield-1 behandelt, die andere blieb unbehandelt.

Um die Art des Zusammenhanges zwischen DBLMSP2 und GDV1 Expression zu untersuchen, wurden zur Berechnung der Korrelation aus drei unabhängigen Commitment Assays die Parasiten aus je drei Gesichtsfeldern ausgezählt. Aus den Daten ergab sich eine signifikant negative Korrelation (Spearman $r = -0,9333$; $P = 0,0007$ (two-tailed)), was darauf hindeutet, dass eine monotone negative Beziehung zwischen der Expression der beiden Proteine besteht (Abbildung 31 D). Durch eine lineare Regression konnte eine signifikant lineare Beziehung zwischen den Datensätzen nachgewiesen werden ($r^2 = 0,7257$; $S_{y,x} = 1,465$; $F = 18,52$; $P = 0,0036$).

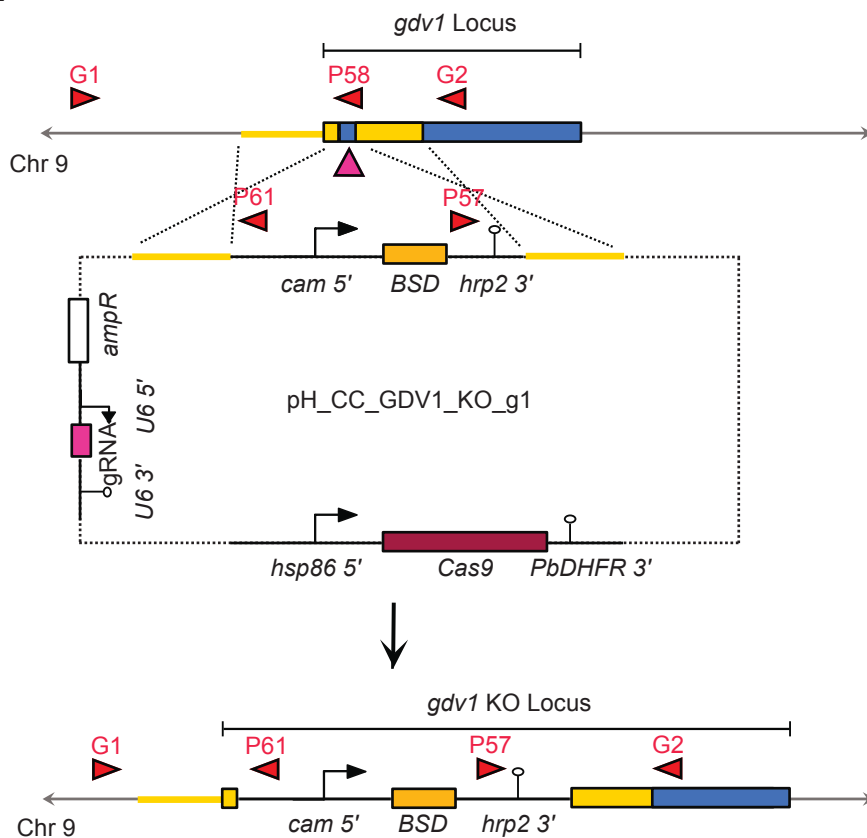
Im Gegensatz dazu ergab das Auszählen der GDV1⁺ und DBLMSP2⁺ Schizonten, dass durchschnittlich 61,1% GDV1⁺ und 5,39% DBLMSP2⁺ nach der Gabe von Shield-1 waren (Abbildung 31 B). Die unbehandelten Parasiten, bei denen keine GDV1⁺ Parasiten zu finden war, waren in 0,9% der Parasiten DBLMSP2⁺. Hierbei lagen die Zahlen der GDV1⁺ wie erwartet im Bereich der zuvor ermittelten Konversionsraten der 3D7-iGP Linie. Genauso wie bei 3D7 Parasiten ließ sich in 3D7-iGP Parasiten ein deutlicher Anstieg der DBLMSP2 Expression feststellen und folglich trotz negativer Korrelation ein bestehender Zusammenhang zwischen DBLMSP2 Expression und sexueller Konversion erneut bestärken.

3.2.5 Die Expression von DBLMSP2 unterliegt einer GDV1-abhängigen Regulation

Wie zuvor schon beschrieben, konnte eine hoch Regulation von *dblmsp2* im Transkriptom von GDV1-überexprimierenden Parasiten im Zusammenhang mit anderen frühen Gametozyten Markern und *ap2-g* nachgewiesen werden. Ebenso wurde eine signifikant erhöhte Zahl von *dblmsp2* Transkripten im Transkriptom des Klons F12 gefunden, der aufgrund einer Mutation kein aktives AP2-G exprimiert und infolgedessen keine Gametozyten bildet. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Regulation von DBLMSP2 von AP2-G unabhängig ist und von einem Faktor an einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Kaskade, die zur sexuellen Differenzierung führt, abhängig ist(103). Zusammengenommen mit der Tatsache, dass mit erhöhter GDV1-Expression eine erhöhte Anzahl DBLMSP2⁺ Schizonten zu finden ist, ist es naheliegend eine GDV1-abhängige Regulation anzunehmen. Da die Parasiten der 3D7-iGP Linie neben dem über Shield-1 regulierbarem GDV1, welches im *cg6* Locus integriert ist und unter der Kontrolle des *cam* Promotors liegt, auch den endogenen *gdv1* Locus transkribieren, wurde um den Zusammenhang der Transkription von *dblmsp2* und GDV1 Expression genauer zu untersuchen ein GDV1 Knockout in der 3D7/DBLMSP2-mScarlet Linie generiert.

Auf Grundlage des pCRISPR-Cas_KO_only wurde ein Plasmid zur Transfektion kloniert. Neben den erforderlichen homologen Sequenzen, die zum Einfügen der BSD-Resistenz-Kassette in den genomischen Locus führen, enthielt das Plasmid eine geeignete gRNA (Abbildung 32 A). Die Transfektion erfolgte in synchrone Ringe der 3D7/DBLMSP2-mScarlet Linie und die Selektion über die Ausbildung der BSD-Resistenz bei erfolgreicher Integration in den *gdv1* Locus. Über PCR wurde die korrekte Integration bestätigt, da kein WT-Locus mehr nachgewiesen werden konnte, wurde auf das Ausklonieren für eine klonale Linie verzichtet (Abbildung 32 B: Primarpaar G1+G2).

A



B

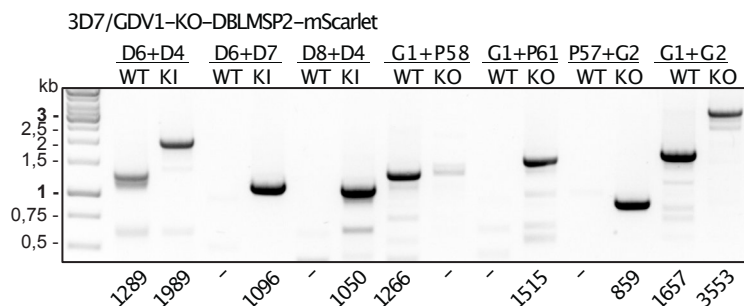


Abbildung 32 Generieren eines funktionalen GDV1-KOs in 3D7/DBLMSP2-mScarlet Parasiten. (A) Schema zur Integration der BSD-Resistenzkassette innerhalb des *gdv1* Locus (blau) um einen funktionalen KO des Gens zu erreichen. Über das CRISPR/Cas9-KO Plasmid wird die BSD-

*Resistenzkassette in den Bereich zwischen die beiden homologen Bereiche (gelb) eingefügt. Die Erkennungsstelle (pinkes Dreieck) der gRNA befindet sich zwischen den beiden homologen Bereichen (gelb) nahe des 3` Ende des Ziellocus. (B) Integrations-PCRs der transgenen Parasitenlinie zur Kontrolle der erfolgreichen Modifikation des Ziellocus. Bindestellen der verwendeten Primer zum Nachweis im *gdv1* Locus sind im Schema in (A) und die für den Nachweis des im *dblmsp2* Locus in Abbildung 1 A dargestellt (rote Dreiecke).*

Um den Einfluss des GDV1-KO auf die Expression von DBLMSP2 zu untersuchen, wurden eng synchronisierte 3D7/GDV1-KO-DBLMSP2-mScarlet Parasiten mit und ohne Zusatz von Cholin zum Medium kultiviert. Durch Zugabe von Compound 2 wurde ein Egress verhindert, bevor die späten Schizonten analysiert wurden. Die Parasiten wurden in 4% Formaldehyd-Lösung fixiert und anschließend die mScarlet⁺ positiven Parasiten mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt.

Im Mittel exprimierten nur 0,52% (+Choline) bzw. 0,44% (-Cholin) der Parasiten DBLMSP2, was dafür spricht, dass die Expression abhängig von GDV1 ist (Abbildung 33 A). Um dies zu bestätigen, wurde zusätzlich eine Linie aus der 3D7/GDV1-KO-DBLMSP2-mScarlet generiert, die GDV1 über ein episomales Plasmid durch Induktion exprimieren kann. Das Plasmid enthielt dieselbe Expressionskassette, wie die im *cg6* Locus integrierte der 3D7-iGP Linie, daher konnte die Expression von GDV1 auch hier über die Gabe von Shield-1 kontrolliert werden. Analog zu den vorangegangenen Experimenten, wurden erneut die DBLMSP2⁺ Schizonten quantifiziert, außerdem konnte zusätzlich die Effizienz der Induktion über das GFP-Signal des GDV1-Fusionsproteins bestimmt werden. Es konnte im Mittel bei 9,9% der Schizonten ein GFP-Signal detektiert werden, was im Vergleich zum endogen codierten GDV1-GFP-DD der 3D7-iGP Linie gering ist. Trotzdem konnte fast eine Verdreifachung der Expression von DBLMSP2 von 0,44% auf 1,22% beobachtet werden (Abbildung 33 B). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Expression von DBLMSP2 definitiv von GDV1 abhängig ist.

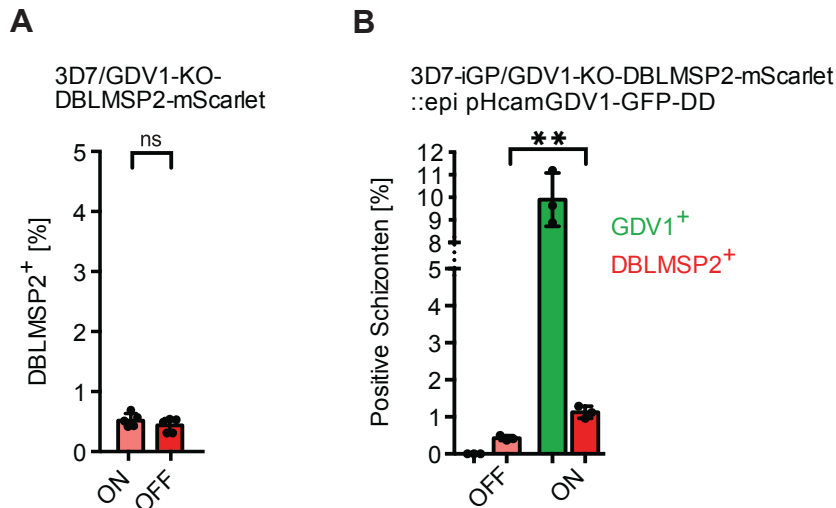


Abbildung 33 GDV1-abhängige Expression von DBLMSP2. (A) Vergleich des Anteils DBLMSP2 exprimierender Schizonten die in RPMI+Cholin (ON) bzw. RPMI (OFF) kultiviert wurden. (B) Anteile DBLMSP2 und GDV1 exprimierender Schizonten in Shield-1 behandelten (ON) und unbehandelten (OFF) Parasiten. Die dargestellten Daten entsprechen min. drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzanalyse wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; $*p > 0,05$) durchgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert inklusive \pm -Standardabweichung sowie die Werte der drei unabhängigen Einzelmessungen (A+B).

3.2.6 Die beiden DBL-Domänen tragenden Proteine der MSP3-ähnlichen Proteinfamilie sind nicht redundant

Nachdem bei dem Oberflächenprotein MSP6 signifikante Sequenzähnlichkeiten zu der konservierten C-terminalen Region von MSP3 und nahezu identische Sequenzen innerhalb der antigenen Domänen gefunden wurden, wurde über diese identischen Sequenzen eine Reihe von ORFs auf Chromosom 10 identifiziert (253). Aufgrund der C-terminalen Ähnlichkeit zu MSP3 wurden sie als MSP3-ähnliche Proteine zu einer Familie zusammengefasst. Im Gegensatz zum C-terminus wurde am N-terminalen Ende eine hohe Divergenz festgestellt, eine Ausnahme bilden hier zwei Gene, die für eine DBL-ähnliche Cystein-reiche Domäne, wie sie auch bei den *var* und den *ebf* Genen zu finden ist, codieren.

In vielen weiteren Studien, die sich mit den Proteinen der MSP3-ähnlichen Familie beschäftigten, wurden diese beiden Proteine, DBLMSP1 und DBLMSP2, aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit häufig miteinander verglichen bzw. befassten sich die meisten Studien mit beiden Proteinen gleichermaßen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit, der Expression in späten Schizonten und der Lokalisation an der Merozoiten-Oberfläche (309) und der Tatsache, dass für *Plasmodium* schon häufig Redundanz sowohl in Stoffwechselwegen als auch bei Proteinen und ihrer Funktion beschrieben wurde (9, 206, 212, 273, 314) sollten die beiden Proteine dahingehend untersucht werden.

3.2.7 DBLMSP1 hat keinen Effekt auf das Überleben der Parasiten und das sexuelle Commitment

Zur näheren Charakterisierung von DBLMSP1 und um einen genaueren Einblick in das Zusammenspiel der beiden Proteine zu bekommen, wurden zuerst via CRISPR/Cas verschiedene DBLMSP1-defiziente Linien generiert. Analog zu dem Knockout von *dblmsp2* wurde über Gibson-Assembly eine *hDHFR*-Kassette flankiert von zwei homologen Regionen in das pCRISPR-Cas_KO_only Plasmid kloniert (Abbildung 34 A). Im Einzelnen wurde das resultierende pH_CC_DBLMSP1_KO_g1 Plasmid in synchrone Ringe der 3D7, 3D7-iGP, 3D7-iGP/DBLMSP2_mScarlet und 3D7-iGP/DBLMSP2-KO Linien transfiziert. Die Integration des Knockouts in den *dblmsp1* Locus der betreffenden Linien wurde über PCR bestätigt, auch hier konnte kein WT-Locus mehr über die PCR nachgewiesen werden (Abbildung 34 B, C, D+E).

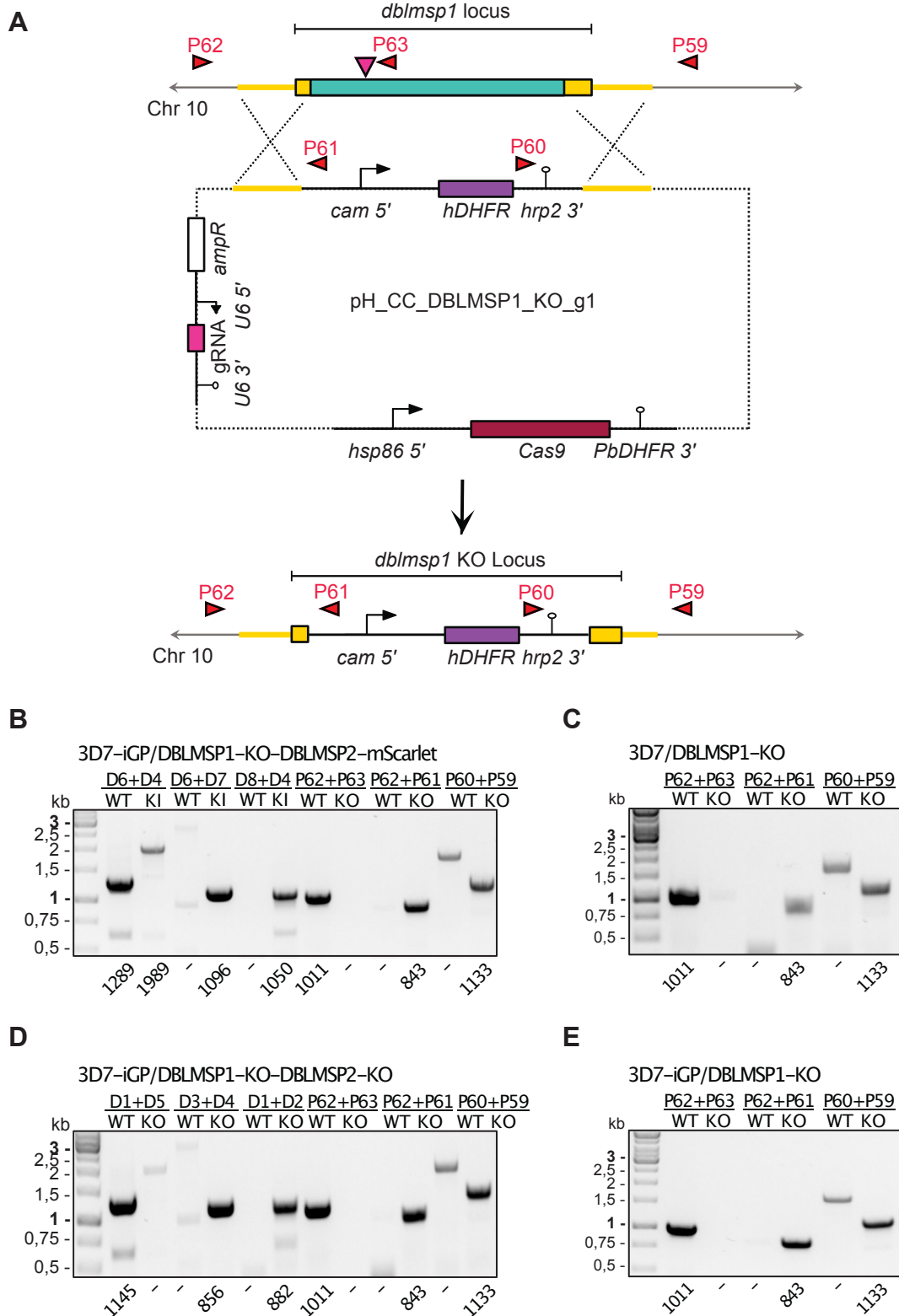


Abbildung 34 Generieren von transgenen Parasiten mit einem funktionalen DBLMSP1-KO. (A) Schema zur Integration der WR-Resistenzkassette innerhalb des *dblmsp1* Locus (türkis) um einen funktionalen KO des Gens zu erreichen. Über das CRISPR/Cas9-KO Plasmid wird die WR-Resistenzkassette in den Bereich zwischen die beiden homologen Bereiche (gelb) eingefügt. Die Erkennungsstelle (pinkes Dreieck) der gRNA befindet sich zwischen den homologen Bereiche (gelb) im Ziel-Locus. (B-E) Integrations-PCRs der transgenen Parasitenlinie zur Kontrolle der erfolgreichen Modifikation des Ziel-Locus. Bindestellen der verwendeten Primer sind im Schema in (A); Abbildung 1 A und 3 A dargestellt (rote Dreiecke).

Da zuvor ein geringer nicht signifikanter Effekt eines DBLMSP1-KO auf den Anstieg der Parasitämie nach einem Zyklus beschrieben wurde (232), wurde überprüft, ob sich dieses verminderte Wachstum über zwei Zyklen potenziert und zu einem signifikant messbaren Unterschied führt. Ein solcher Effekt ließ sich bei drei unabhängigen Messungen mit 3D7/DBLMSP1-KO Parasiten wie erwartet nicht feststellen (Abbildung 35 A). Gleichzeitig zeigte sich auch kein Unterschied in den sexuellen Konversionsraten, der 3D7-iGP/DBLMSP1-KO Parasiten verglichen mit der 3D7-iGP Linie (Abbildung 35 B).

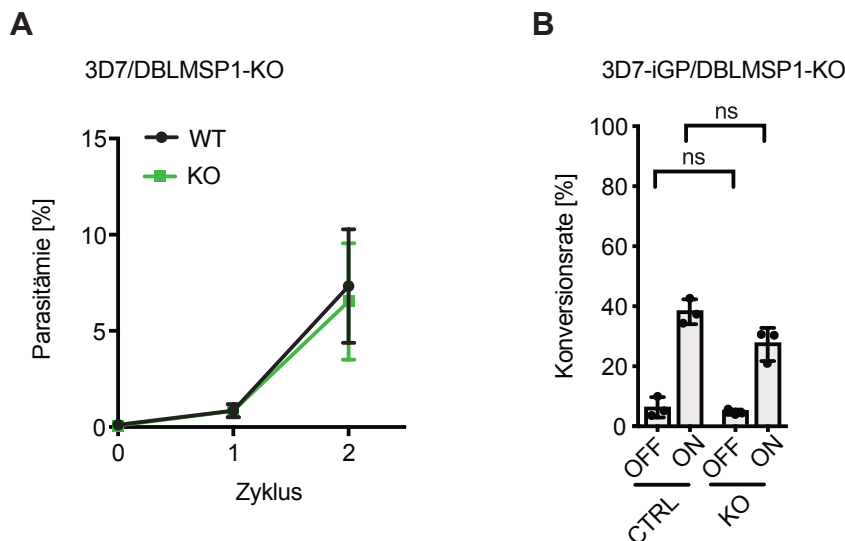


Abbildung 35 Einfluss des „Single“ DBLMSP1-KO auf die asexuelle Proliferation und die sexuelle Konversion. (A) Wachstumskurve über zwei Zyklen. Gemessen wurde die Zunahme der Parasitämie von 3D7 (WT) und 3D7/DBLMSP1-KO (KO) mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den dazugehörigen Standardabweichungen. (B) Sexuelle Konversionsraten der 3D7-iGP/DBLMSP1-KO (KO) im Vergleich zur 3D7-iGP (CTRL). Konversionsraten wurden als Quotient der Anzahl von Parasiten von Tag 7 und Tag 2 nach der Reinvansion anhand von Giemsa-gefärbten Ausstrichen bestimmt. Die dargestellten Daten entsprechen drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzanalyse wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; * $p < 0,05$) durchgeführt.

3.2.8 Das Fehlen beider Proteine hat keinen direkten Effekt auf die Entwicklung von *P. falciparum*

Im Gegensatz zu der von Lin *et al.* aufgestellten Hypothese, dass DBLMSP1 und DBLMSP2 eine gemeinsame essentielle Funktion teilen, da es nicht möglich ist beide Gene auszuschalten (172), war es mit dem CRISPR/Cas9 System möglich (Abbildung 34 A). Daher kann eine gemeinsame essentielle Funktion der beiden Proteine ausgeschlossen werden.

Trotzdessen besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die gemeinsame Funktion nicht essentiell ist und daher der Knockout beider Proteine möglich gewesen ist. Daher wurde die asexuelle und sexuelle Entwicklung näher betrachtet, aber es konnte kein

nennenswerter Effekt auf das asexuelle Wachstum festgestellt werden (Abbildung 36 A). Auch die Induktion von sexueller Konversion zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 36 B).

Daher ist eine Redundanz der Funktion von DBLMSP1 und DBLMSP2 während der intraerythrozytären Entwicklung eher unwahrscheinlich.

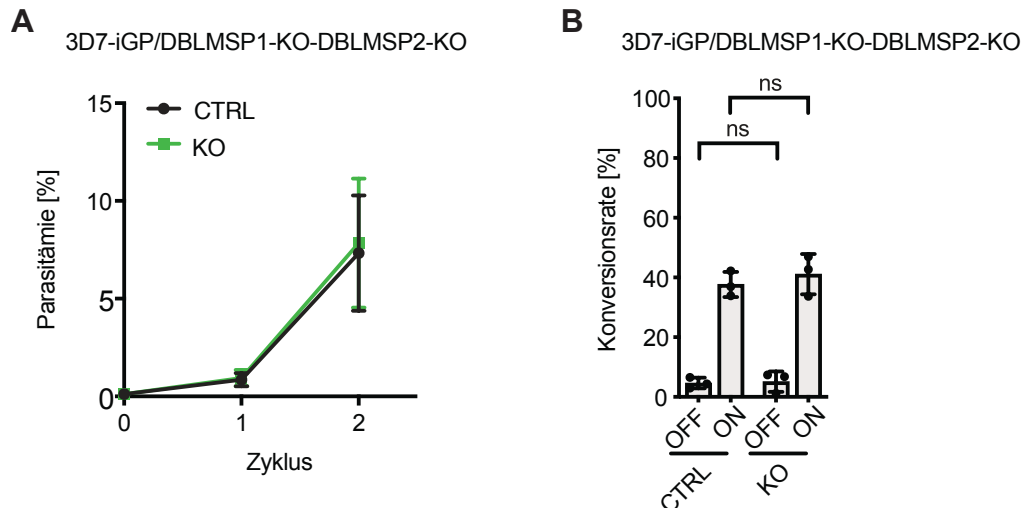


Abbildung 36 Einfluss des doppelten Knockouts von DBLMSP1 und DBLMSP2 auf die asexuelle Proliferation und die sexuelle Konversion. (A) Wachstumskurve über zwei Zyklen. Gemessen wurde die Zunahme der Parasitämie von 3D7-iGP (CTRL) und 3D7-iGP/DBLMSP1-KO-DBLMSP2-KO (KO) mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den dazugehörigen Standardabweichungen. (B) Sexuelle Konversionsraten der 3D7-iGP/DBLMSP1-KO-DBLMSP2-KO (KO) im Vergleich zur 3D7-iGP (CTRL). Konversionsraten wurden als Quotient der Anzahl von Parasiten von Tag 7 und Tag 2 nach der Reinvasion anhand von Giemsa-gefärbten Ausstrichen bestimmt. Die dargestellten Daten entsprechen drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzanalyse wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; $*p > 0,05$) durchgeführt.

3.2.9 Die Expression von DBLMSP2 wird nicht durch den Knockout von DBLMSP1 verstärkt

Letztlich sollten Informationen darüber gewonnen werden, ob DBLMSP1 einen Effekt auf die Expression von DBLMSP2 hat. Es sollte zum einen überprüft werden, ob eine erhöhte Expression in späten Schizonten festgestellt werden kann und zum anderen, ob ein Unterschied in Folge von induziertem Commitment nachweisbar ist.

Außerdem wurde darauf geachtet, ob DBLMSP2 weiterhin an der Oberfläche von Merozoiten lokalisiert.

Die nach induziertem sexuellen Commitment isolierten und fixierten Schizonten zeigten ebenso wie die nicht-induzierten eine Lokalisation von DBLMSP2 vergleichbar mit der Lokalisation in WT-Parasiten (Abbildung 37 C). Demzufolge hat der Knockout von *dblmsp1* keine Mislokalisierung von DBLMSP2 zur Folge.

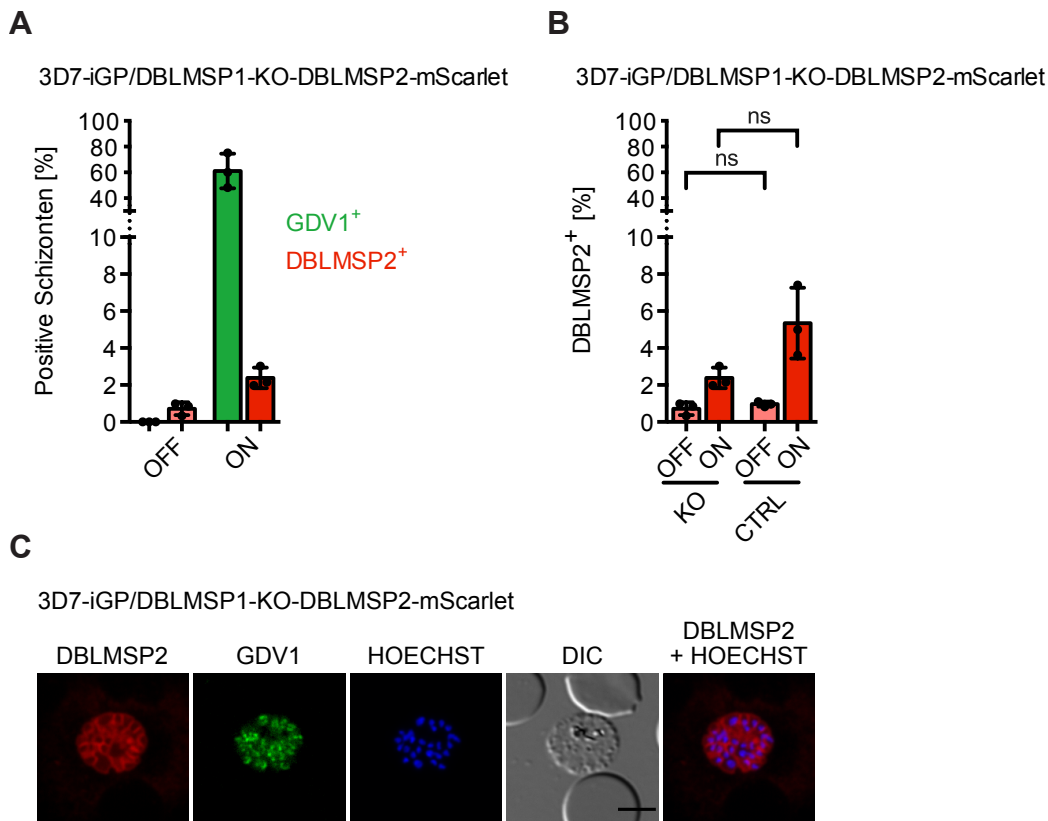


Abbildung 37 Expression von DBLMSP2 in Abwesenheit von DBLMSP1. (A) Anteile DBLMSP2- und GDV1-exprimierender Schizonten in Shield-1 behandelten (ON) und unbehandelten (OFF) Parasiten. (B) Vergleich der Anteile von DBLMSP2⁺ Schizonten in Shield-1 behandelten (ON) und unbehandelten (OFF) Kulturen von 3D7-iGP/DBLMSP1-KO-DBLMSP2-mScarlet (KO) und 3D7-iGP (CTRL) Parasiten. Die dargestellten Daten entsprechen min. drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzanalyse wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; * $p > 0,05$) durchgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert inklusive \pm -Standardabweichung sowie die Werte der drei unabhängigen Einzelmessungen (A+B). (C) Lokalisation von DBLMSP2 und GDV1 in DBLMSP1-KO Parasiten. Die Lokalisation der Fusionsproteine wurden nach der Behandlung mit Shield-1 mit Hilfe von Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie in den transgenen Parasiten untersucht. Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt. Maßstab= 5 μ m.

Das Auszählen der Schizonten ergab bei gleichen Raten von GDV1⁺ Parasiten wie erwartet nach Induzierung von Commitment im Mittel eine höhere Rate von DBLMSP2⁺ Schizonten, als ohne Induktion von ca. 2,4% und 0,7% (Abbildung 37 A). Überraschenderweise ließ sich kein signifikanter Unterschied zur 3D7-iGP/DBLMSP-mScarlet Linie feststellen, obwohl der Anteil von DBLMSP2 exprimierenden Schizonten hier mit ca. 5,4% mehr als doppelt so hoch ist. Allerdings zeigt sich hier eine höhere Varianz der Einzelmessungen (Abbildung 37 B).

Somit lässt sich auch hier kein gegenseitiger Effekt der Proteine aufeinander nachweisen. Ebenso ist eine Redundanz ihrer Funktion auch sehr unwahrscheinlich, da sich keine vermehrte Expression von DBLMSP2 in Abwesenheit von DBLMSP1 nachweisen ließ.

3.3 Identifizierung und Charakterisierung einer putativen funktionellen Domäne von GDV1

Um einen tieferen Einblick in die Funktionsweise und die mögliche Interaktion von GDV1 mit dem Heterochromatin zu untersuchen, wurde mit Hilfe der Aminosäuresequenz über die Onlinetools I-TASSER und AlphaFold die wahrscheinlichste Struktur des Proteins berechnet.

3.3.1 Modellierung der Struktur von GDV1 über AlphaFold 2 und I-TASSER

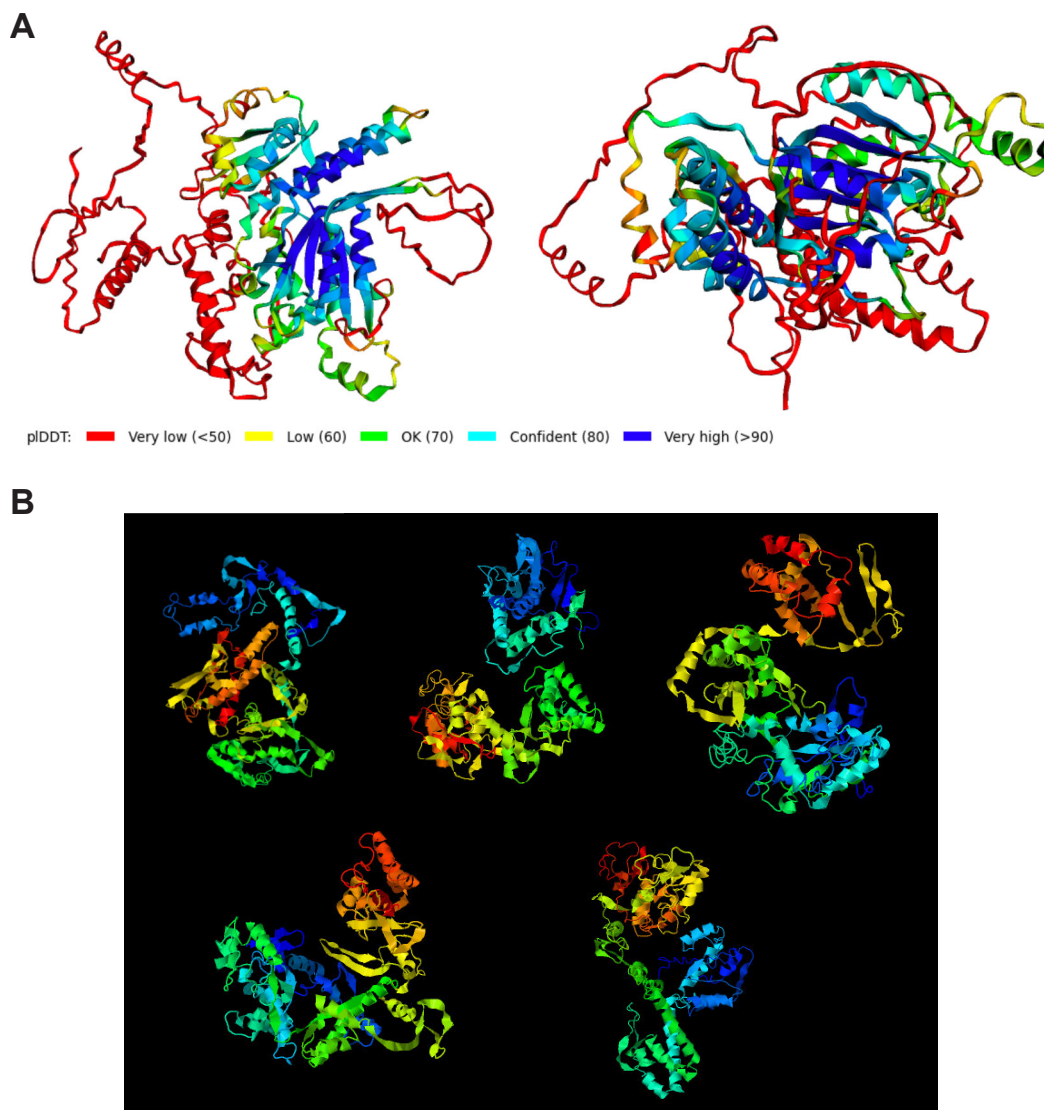


Abbildung 38 Mögliche dreidimensionale Struktur von GDV1. (A) Struktur von GDV1. Zweidimensionale Darstellung der über ColabFold berechneten 3D-Struktur von GDV1 aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln. Die einzelnen Bereiche sind entsprechend der pLDDT-Werte farbig (Legende in der Abbildung) dargestellt. (B) Darstellung der Top 5 der über iTasser berechneten möglichen Strukturen von GDV1.

Bisher wurde die Struktur des GDV1 durch Kristallstrukturanalyse oder Kernspinresonanzspektroskopie noch nicht experimentell aufgeklärt. Zum besseren Verständnis der generellen Funktionsweise und im Besonderen der Art der Interaktion des GDV1 mit Heterochromatin ist es zumindest notwendig eine Vorhersage der Struktur basierend auf der Aminosäuresequenz zu berechnen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Tools zur Strukturberechnung verwendet. Während ColabFold basierend auf AlphaFold2 (196) eine mögliche Struktur für GDV1 (Abbildung 38A) berechnet hat, gibt I-TASSER (322) basierend auf den am besten passenden Templates fünf mögliche Modelle aus (Abbildung 38B). Im Zentrum der über AlphaFold2 berechneten Struktur befinden sich in einer Ebene liegende β -Faltblattstrukturen umgeben von α -Helices, in diesem Bereich liegen die pLDDT-Werte zwischen 70 und über 90, was die Strukturvorhersagen in diesen Bereichen verlässlich genug zur Charakterisierung von Bindestellen macht. In den darum liegenden äußeren Bereichen sinken die pLDDT-Werte unter 50, weshalb die Ergebnisse dieser Bereiche eher ungeeignet als Grundlage für Aussagen über die Proteineigenschaften sind.

Über den von I-TASSER genutzten TM-align Algorithmus (321) wurden zusätzlich strukturell ähnliche Proteine aus der PDB Datenbank identifiziert. Bei den ersten 10 Ergebnissen handelt es sich um als Hydrolasen bzw. DNA-bindende Proteine klassifizierte Cas12a und CasX Proteine des Typ V CRISPR/Cas Systems, welche die Funktion einer Nuklease erfüllen. Die nachgewiesene Assoziation des GDV1 mit HP1 und die strukturelle Ähnlichkeit mit DNA-interagierenden Proteinen bestärkt die Vermutung, dass die molekulare Funktion von GDV1 vermutlich die direkte Interaktion mit dem Heterochromatin ist.

3.3.2 Der hochkonservierte Bereich der *gdv1* Sequenz innerhalb der Primaten infizierenden *Plasmodium* Spezies ähnelt einer PIN-Domäne

Zur weiteren Aufklärung der molekularen Funktion des Proteins, sollten zuerst mögliche katalytisch aktive Domänen und darüber hinaus die funktionalen Aminosäurereste identifiziert werden. Um die konservierten Bereiche der GDV1-Sequenz zu bestimmen, wurden Sequenz-Alignments mit den homologen GDV1 Sequenzen verschiedener *P. falciparum* Isolate (<https://plasmodb.org/plasmo/app/>) und mit orthologen Sequenzen Primaten infizierender *Plasmodium* Arten, wie *P. adleri*, *P. billcollinsi*, *P. brasilianum* und *P. knowlesi*, durchgeführt (98).

Innerhalb der *P. falciparum* Linien ist der *gdv1* Locus nahezu identisch mit einer Ähnlichkeit der Sequenz zueinander von 99,83%. Ein Alignment der Sequenz von

PF3D7_0935400 mit der Konsensus-Sequenz der Primaten infizierenden Orthologen zeigt nur noch eine Sequenzidentität von 35,35% und eine Ähnlichkeit von 42,02%, wobei sich höher konservierten Bereiche, in denen sich identische bzw. ähnliche Reste befinden auf höchstens 20 aufeinanderfolgende Aminosäuren begrenzt sind (Abbildung 39).

Consensus	1	MXXXXXXXXXXVXXXXRRXXXXXXXXXXEKKKPWYLLXKXXXXFFDLXEDXXXXXXXXXXXXXXXXXX	70
PF3D7_0935400	1	MNYKKETCVKLKVKGNSRRRNSASRKMFE-----WYLYLDNHTKGLFY-LNTNDSDTNDAGCEDLVH---	62
Consensus	71	XXXXFKXXVXXKEXEXCXXVIXXSEEXXXKEDXXKXNXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXNV	140
PF3D7_0935400	62	-----IYKMKKNELCRHVISLNSSEYAIKKEEAK--NNYINIEEDVYYNSDIEQYVDDRKGNSVDL	122
Consensus	141	XXXXXXXXXXXXXDXXXXXXXXXXXSYXYXKXXNXXR--CXXXKKSFNLLLYLNTFLXXLXNKKXXXX	208
PF3D7_0935400	122	-----LSSPYIDRNINNSIGKCFCEMKKSFNSLMYLDNHLSTYFYGNKKEEMG	171
Consensus	209	XFLXXFNKRFXXNXXNKGXXNNFKXDLXIGIXXXGIXSFKLLXXN-EXXKXTYYMNEELLXXEIXNIL	277
PF3D7_0935400	172	NFLQENYKRFEDVCNGLNLFKSDIYEIGIYEENIVSFKLLDCPNRHLIKNTYYMNDLIFNEIHLL	241
Consensus	278	XXXYPLKXIFNXXXXVKXFQKXVXPXXLKXDKPIXFGIXLDFDYXRXSFEXNXXRXXMLXDLXIIDKIC	347
PF3D7_0935400	242	NKMYPLKHIMNNHHLVKKYQKKV-PEHLKMEKALKFGIVLDFDYVRENFENNLKMTLLDFLIIDKIW	310
Consensus	348	EIFRENCXVIYVHXXXXXXXXXXNXXEKKKXNXXKXYSYXFXDLXXTLKLFERNIKVVIRXNXFXSXX	417
PF3D7_0935400	311	EIFRQNCVIMFLHVCIFKDNNTN-----KDINNHRKRYSYMYEDLKNLTLDLKQKGIPIVVMRINPFQS-F	374
Consensus	418	XXSXKXKXNXXIXDXXLFNXXVNDIXLXTNDXDVISYCYXXRHXY-----	467
PF3D7_0935400	375	RLFNHNEFSNPFIQDVNDLYMNERVDHIIILVTNDSDVISYSYHFDHTIIYCIKDKYKNVTNPINSDIN	444
Consensus	467	-----KXXXXXXXXXXTFXFKPVXIXSFLNNLPXKNNKIXPXLXDXFCYMTFIIIXTLXRXQA	528
PF3D7_0935400	445	VDTITHPETTNINISNHYKNHNTIMFKKPVILICSLNNLPKNNKIHDDIILDFCYMTYIIKTLYFRFQS	514
Consensus	529	RXIXXXXXXKXXXXLVXXXIXKXNXXNXXLKXKINLXXLDDIYKXXXXKXKXSIXXLLXXFXSPX	598
PF3D7_0935400	515	RSIRNMLKSNLNTTNFVINRITQMNNTNRLKKNKINLXXLDDIYKIRPRKENKNVSIHLLQKAYSPF	584
Consensus	599	YYPXHYXXE-----X	609
PF3D7_0935400	585	YYPIHYIYIKKCTYK	599

Abbildung 39 Sequenz-Alignment der 3D7 GDV1 Sequenz mit der Konsensus-Sequenz der Primaten infizierenden Plasmodium Arten. Durchgeführt wurde ein globales Alignment mit Needleman-Wunsch-Algorithmus. Sequenzen der einzelnen Arten wurden aus PlasmoDB genommen. Die Graphische Darstellung erfolgte mit SnapGene. Identische AS sind in schwarz, ähnliche in Blau und abweichende in rot dargestellt.

Zur Identifizierung von funktionalen Domänen innerhalb der konservierten Sequenzbereiche wurden über HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>) und Foldseek (<https://search.foldseek.com/search>) Homologien zu Proteinen anderer Organismen gesucht.

Über HHpred wurde die Suche in den Referenzdatenbanken (PDB_mmCIF70_24_Oct; UniProt-SwissProt-viral70_3_Nov_2021; NCBI_Conserved_Domains (CD_v3.19) sowohl mit der Konsensus-Sequenz der Primaten infizierenden (Abbildung 40B) als auch der *P. falciparum* Linien durchgeführt. In beiden Fällen wurde für den zwischen Valin (V264) und Valin (V411) liegenden Bereich mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 bis 90%, homologe Bereiche zu PIN-Domänen von Proteinen anderer Organismen gefunden (Abbildung 40A und B; Tabelle 5). Bei der PIN (PilT N-terminus) Domäne handelt es sich um eine RNA-bindende Domäne, welche in fast allen Lebewesen zu finden ist (244). Sie besteht aus 120 Aminosäure-Resten, die in einem zentralen und parallelen β -Faltblatt umgeben von α -Helices und einem aktiven Zentrum aus 4 bis 5 Metallionen-bindenden

sauren Aminosäure-Resten angeordnet sind. In Eukaryoten sind PIN-Domänen häufig Teil eines größeren Proteins und meist in RNA-spaltenden Prozessen involviert.

Mit Hilfe der Sequenzen dieser PIN-Domänen wurden über ein weiteres Alignment mit den *P. falciparum* GDV1 Sequenzen vier Asparaginsäure-Reste an den Positionen D389, D400, D408 und D410 als die am höchsten konservierten Aminosäurereste identifiziert (Abbildung 40C).

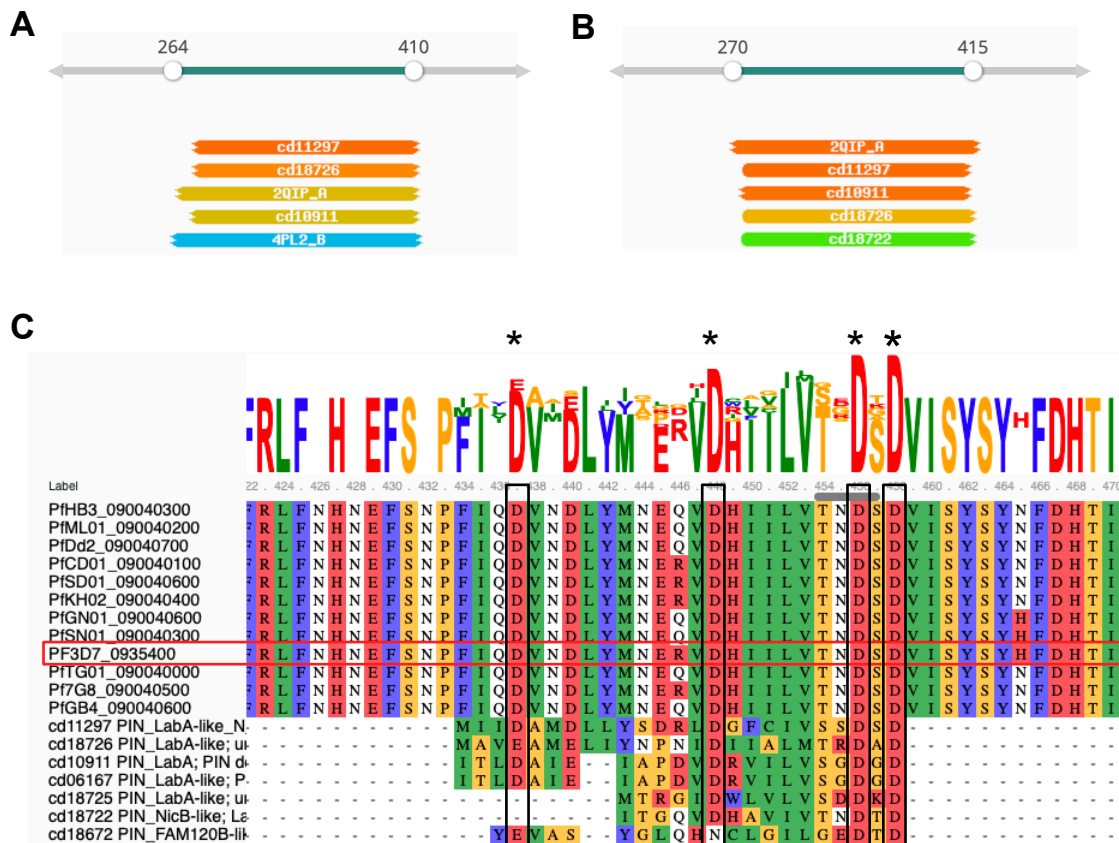


Abbildung 40 Visualisierte Darstellung der HHPred Suche nach putativen funktionalen Domänen von GDV1. (A) Strukturell ähnliche Domänen und Proteine zur Konsensus-Sequenz (grau) aus dem Alignment der GDV1 Sequenzen der *P. falciparum* Linien. Es wurden Homologien zu anderen Proteinen im Bereich zwischen den AS 264 und 410 (grün) gefunden. (B) Strukturell ähnliche Domänen und Proteine zur Konsensus-Sequenz (grau) aus dem Alignment der GDV1 Sequenzen der Primaten-infizierenden *Plasmodium* Arten. Es wurden Homologien zu anderen Proteinen im Bereich zwischen den AS 270 und 415 (grün) gefunden. (C) Alignment der GDV1 Sequenzen der Primaten-infizierenden *Plasmodium* Arten und den Top Hits der HHPred Suche. Die hochkonservierten ASP Reste sind mit einem Stern gekennzeichnet und die *P. falciparum* 3D7 Sequenz mit einem roten Rahmen.

Tabelle 5 Top Hits der HHPred Suche nach homologen Strukturen zu anderen Proteinen und möglichen funktionalen Domänen

Accession No.	Beschreibung	Wkt.	E-Value	Ident. Sequenz	Alignment	
					Query	Ziel
Query: <i>P. falciparum</i> GDV1 Sequenzen (Abbildung 40A)Tabelle 7						
cd11297	PIN_LabA-like_N1; uncharakterisierte Subfamilie der N-terminalen LabA-like PIN domains	90,64%	7,6	16%	277-410	2-96
cd18726	PIN_LabA-like uncharackterisierte Subfamilie (<i>Synechococcus elongatus</i>)	88,63%	4,6	17%	277-410	2-93
2QIP_A	Protein unbekannter Funktion (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	83,21%	15	16%	267-410	3-120
cd10911	PIN_LabA (<i>Synechococcus elongatus</i>)	82,6%	20	15%	275-410	2-111
4PL2_B	Dual-specificity RNA-methyltransferase RlmN	56,19%	220	16%	264-411	200-335
Query: Konsensus-Sequenz der orthologen GDV1 Sequenzen (Abbildung 40B)						
2QIP_A	Protein unbekannter Funktion (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	90,65%	7,8	15%	270-415	6-125
cd11297	PIN_LabA-like_N1; uncharakterisierte Subfamilie der N-terminalen LabA-like PIN domains	90,67%	3,3	15%	276-410	1-96
cd10911	PIN_LabA (<i>Synechococcus elongatus</i>)	90,42%	3,6	14%	275-410	2-111
cd18726	PIN_LabA-like uncharackterisierte Subfamilie (<i>Synechococcus elongatus</i>)	84,2%	8,5	17%	276-413	1-96
cd18722	PIN_NicB-like; LabA-like PIN domain (<i>Pseudomonas putida</i>)	74,25%	9,3	16%	275-413	1-167

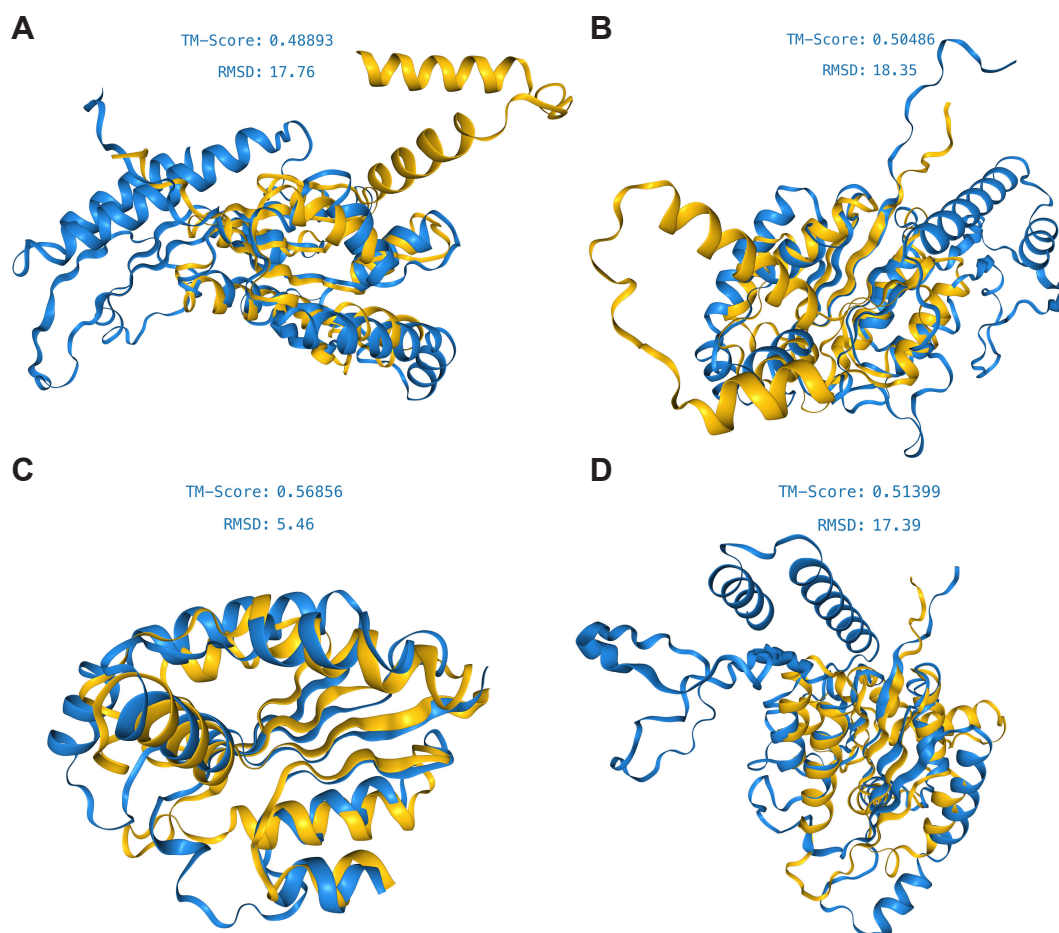


Abbildung 41 FoldSeek-Alignments der putativen funktionalen Domäne mit strukturell ähnlichen Domänen. Die Domänen (gelb) mit denen die in (A-D) dargestellten Alignments mit GDV1 (hellblau) durchgeführt wurden entsprechen den ersten vier Ergebnissen aus Tabelle 6.

Tabelle 6 Top Hits der Foldseek Suche nach GDV1 strukturell ähnlichen Proteinen

Accession No.	Beschreibung	Wkt.	E-Value	Ident. Sequenz	Alignment	
					Query	Ziel
Query: PF3D7_0935400 (Accession No.: Q8I2G6; Abbildung 41A-D)						
A0A519Z0G5	NYN-Domäne-enthaltendes Protein (Gen EOP36_08905; <i>Rubrivivax sp.</i>)	0,38	5,27e ⁻¹	10,9	264-545	1-195
J4PCM9	HTH-Domäne vom OST-Typ-enthaltendes Protein (Gen QWC_12131; <i>Achromobacter marplantensis</i>)	0,25	1,7e ⁰	10,2	263-538	2-191

Ergebnisse

Accession No.	Beschreibung	Wkt.	E-Value	Ident. Sequenz	Alignment	
					Query	Ziel
A0A8457MRB6	NYN-Domäne-enthaltendes Protein (Gen GX344_02360; <i>Intrasporangiaceae bacterium</i>)	0,2	7,84e ⁰	12,6	273-416	2-133
A0A6L8KSI1	NYN-Domäne-enthaltendes Protein (Gen GTP58_10695; <i>Duganella sp.</i>)	0,18	3,88e ⁰	11	269-541	3-190
A0A366GKY2	Uncharakterisiertes Protein der LabA/DUF88 Familie (Gen DFP87_1011141; <i>Achromobacter marplantensis</i>)	0,11	4,36e ⁰	9,9	263-587	2-242
A0A519ZJJ7	NYN-Domäne-enthaltendes Protein (Gen EOP40_12160; <i>Rubrivivax sp.</i>)	0,11	4,36e ⁰	10,4	263-587	2-242
A0A6M5YYP4	NYN-Domäne-enthaltendes Protein (Gen FTUN_6573; <i>Frigoriglobus tundricola</i> .)	0,08	6,57e ⁰	8,9	270-537	1,218

Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten durch ein Alignment der GDV1-Struktur gegen in Proteindatenbanken gespeicherte Proteinstrukturen mit Hilfe von Foldseek (23, 290). In der AFBD50 (Foldseek geclusterte AlphaFold Datenbank (23)) wurden sieben Proteine mit Strukturähnlichkeit gefunden, fünf NYN-Domäne-enthaltende Proteine, bei einem handelt es sich um ein Protein aus der Familie der LabA/DUF88 und ein weiteres gehört zu den HTH-Domänen vom OST-Typ-enthaltenden Proteinen (Tabelle 6). Unter den sieben Ergebnisse waren variierende Regionen im Bereich zwischen den Aminosäuren Lysin (K263) bis Prolin (P587) in der GDV1 Proteinsequenz. In Abbildung 41 sind die Alignments mit den Strukturen der ersten vier Ergebnisse dargestellt und es lässt sich bei allen in weiten Teilen eine Übereinstimmung der Struktur erkennen. Die NYN-Domäne weist, ähnlich den PIN und FLAP Domänen, eine α/β -Struktur mit fünf Faltblattsträngen und vier Helices auf, die wiederum hochkonserviert vier Asp-Reste enthalten (10). Außerdem wird vermutet, dass die PIN-ähnliche Faltung aus der NYN-Domäne hervorgegangen ist und somit auch die PIN-Domänen. Weitere Ergebnisse wurden in der CATH50 Datenbank (170, 249) gefunden, in der hauptsächlich Informationen zur evolutionären Verwandtschaft der einzelnen Proteine bereit gestellt werden und eine

Zuordnung in homologe Superfamilien erfolgt. Die ähnlichsten hier angezeigten Proteine von *Burkholderia pseudomallei*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Danio rerio* werden der HUP Superfamilie zugeordnet, deren Mitglieder eine hohe Diversität in Struktur und Funktion aufweisen. (76). Beim strukturellen Kern der HUP-Domäne handelt es sich um eine Rossmann Faltung, die aus einem β -Faltblatt auf beiden Seiten umgeben von α -Helices besteht (13). Die Funktionen reichen von Aminoacyl-tRNA Synthetasen (AATRSs), Elektronentransfer Flavoproteinen (ETFs), ATP-Pyrophosphatasen (ATP-PPASen), Nucleotidyltransferasen (NTs) bis zum Universalen Stress Protein A (USPA)(76).

3.3.3 Genetische Modifikation des *gdv1* Locus für einen Genknockout und GDV1 Varianten

Nachdem die putativen funktionellen Aminosäuren der konservierten Domäne des GDV1 über Alignments identifiziert wurden, sollte überprüft werden, ob die einzelnen Reste an der Funktion des GDV1 beteiligt sind. Hierfür wurde zum einen ein endogener Knockout des Locus in 3D7 Parasiten generiert und für die episomale Expression der GDV1 Varianten Vektoren kloniert, die unterschiedlich modifizierte *gdv1* Sequenzen unter der Kontrolle eines *cam*-Promotors codieren.

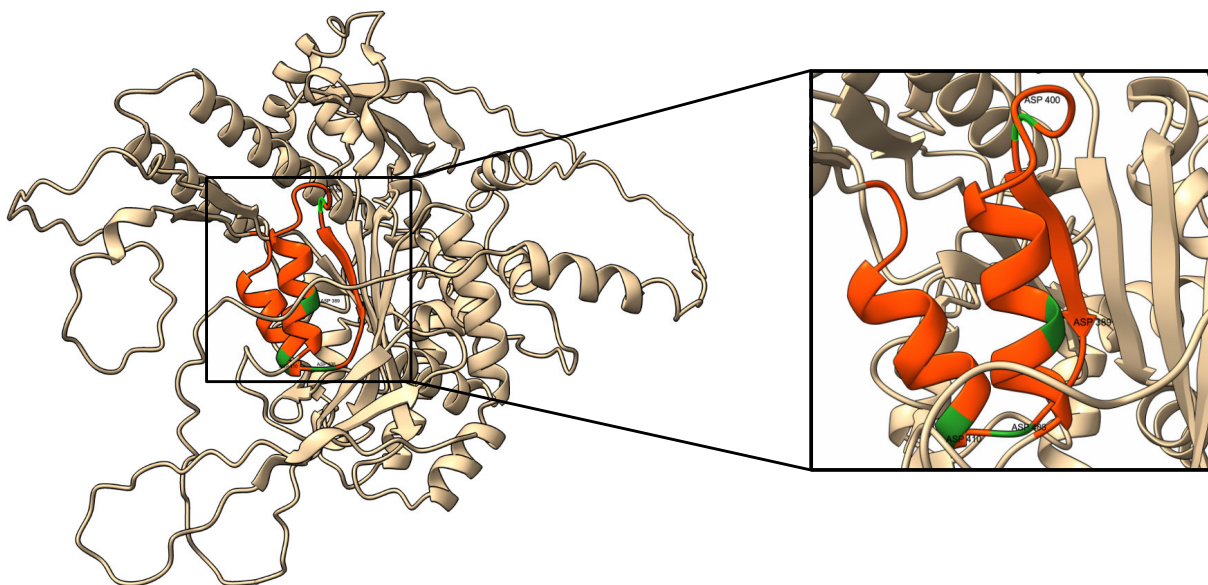


Abbildung 42 Position der putativen funktionalen Domäne von GDV1. In der durch AlphaFold2 vorhergesagten dreidimensionalen Struktur von GDV1 (beige) ist der Bereich der putativen Domäne zwischen Pro (P385) und His (H420) in orange hervorgehoben. Die konservierten Asp sind grün markiert. Auf der rechten Seite ist die Region vergrößert dargestellt.

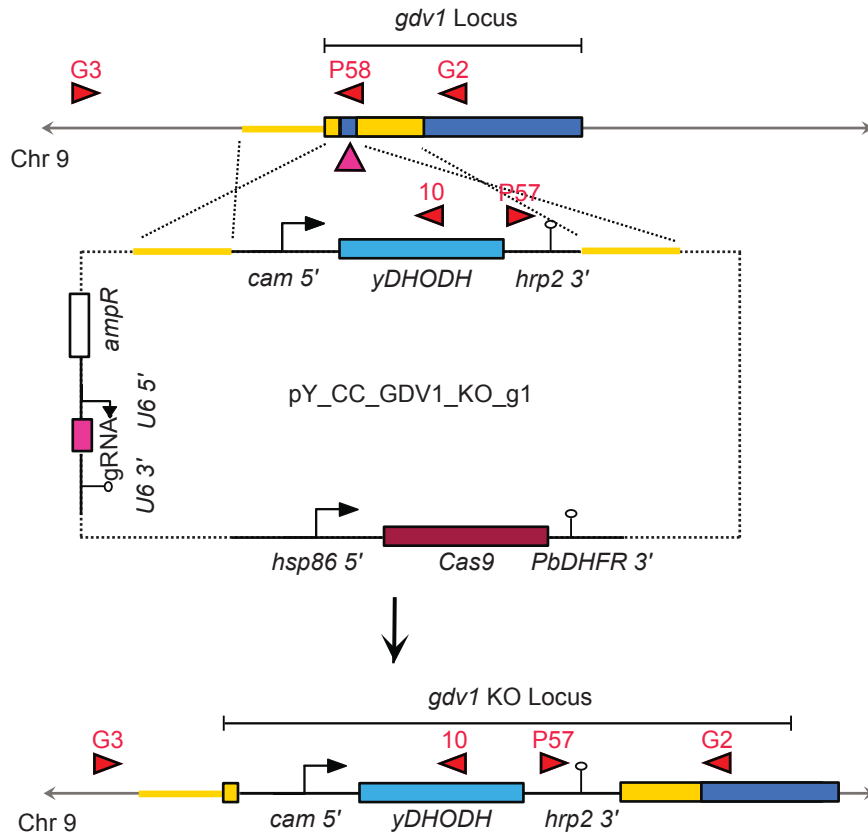
Bei den einzelnen Varianten wurde sich dafür entschieden, zum einen eine Mutation in das Protein über den Austausch der Asparaginsäure durch Alanin und zum anderen

gegen Asparagin eingefügt. Alanin wird häufig für die gezielte Mutation eines putativen funktionellen Rests gewählt, da es sich um eine unpolare Aminosäure handelt, die in der Regel keine Wechselwirkungen mit anderen Molekülen eingeht und daher eine gewisse biochemische Stabilität gewährleistet. Außerdem ist durch das Fehlen von Wechselwirkungen mit anderen Molekülen der Verlust der spezifischen Funktion gegeben, was gleichzeitig auch zu gravierenden Veränderungen in der Struktur des Proteins führen und somit über die fehlgefaltete Struktur zu einem Funktionsverlust führen kann. Ein Austausch durch Asparagin, welches der Asparaginsäure in Polarität und Struktur ähnlicher ist, sollte daher weniger drastische Effekte auf die Proteinstruktur zur Folge haben. Als letzte Variante wurde der Bereich der Sequenz der putativen PIN-Domäne entfernt, wobei hier darauf geachtet wurde, dass unter Berücksichtigung der vorhergesagten Struktur nicht innerhalb einer Helix-Faltung o.ä. die Aminosäuren entfernt wurden. Die einzelnen Modifikationen sind im Detail in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7 Modifikationen der einzelnen GDV1mut Varianten

	Plasmid	Modifikation
CTRL	pHcamGDV1-GFP-DD (103)	
GDV1-ASP/ASN	pHcamGDV1-ASP/ASN	Austausch von Asp(389) und Asp(400) gegen Asn
GDV1-ASP/ALA	pHcamGDV1-ASP/ALA	Austausch von Asp(408) und Asp(410) gegen Ala
GDV1-ALA	pHcamGDV1-ALA	Austausch von Asp(389), Asp(400), Asp(408) und Asp(410) gegen Ala
GDV1Δ384-421	pHcamGDV1Δ384-421	Deletion aller AS von Pro(385) bis His(420)

A



B

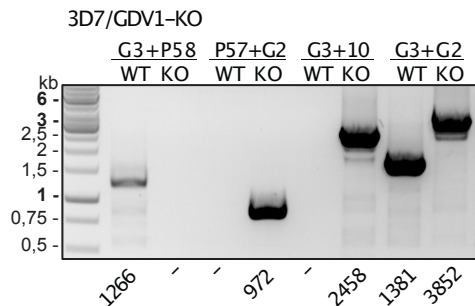


Abbildung 43 Generieren von transgenen 3D7 Parasiten mit einem funktionalen GDV1-KO.

(A) Schema zur Integration der DSM1-Resistenzkassette innerhalb des *gdv1* Locus (blau) um einen funktionalen KO des Gens zu erreichen. Über das CRISPR/Cas9-KO Plasmid wird die DSM1-Resistenzkassette in den Bereich zwischen die Beiden homologen Bereiche (gelb) eingefügt. Die Erkennungsstelle (pinkes Dreieck) der gRNA befindet sich außerhalb der homologen Bereiche (gelb) nahe des 3` Ende des Ziel-Locus. (B) Integrations-PCRs der transgenen Parasitenlinie zur Kontrolle der erfolgreichen Modifikation des Ziel-Locus. Bindestellen der verwendeten Primer sind im Schema in (A) dargestellt (rote Dreiecke).

Zur Generierung des GDV1 Knockouts wurde das pCRISPR-Cas_KO_only Plasmid als Grundlage genommen und neben den homologen Sequenzen, die die DSM1-Resistenzkassette flankieren, eine geeignete gRNA eingefügt. Die Transfektion des Vektors erfolgte in 3D7-WT Parasiten, die im Anschluss durch Gabe von DSM1 auf eine erfolgreiche Integration in den *gdv1* Locus selektiert wurden (Abbildung 43 A). Die

korrekte Integration in den Locus wurde über eine PCR nachgewiesen, auf das Generieren einer klonalen Linie konnte verzichtet werden, da kein WT-Gen mehr im *gdv1* Locus der Kultur nachweisbar war (Abbildung 43 B; Primerpaar: G3+G2).

Für die vier verschiedenen GDV1 Varianten wurden über PCR-Mutagenese die gewünschten Punktmutationen und die Deletion der PIN-Domäne eingeführt. Hierfür wurden Primer mit der gewünschten Mutation in der Sequenz generiert und zur Amplifikation der WT-Sequenz eingesetzt. Anschließend wurden über Gibson-Ligation die einzelnen Fragmente ligiert und in den pHcamGDV1-GFP-DD Plasmid, aus dem zuvor durch Restriktionsverdau die WT-Sequenz des GDV1 entfernt wurde, kloniert. Da die GFP-DD codierende Sequenz im Plasmid belassen wurde, konnte die episomale Expression des GDV1 nach der Transfektion über die Gabe von Shield-1 kontrolliert werden. Die vier pHcamGDV1mut-GFP-DD und der pHcamGDV1-GFP-DD Vektor, der als Kontrolle dienen sollte, wurden in 3D7/GDV1-KO Parasiten transfiziert. Da sich auf dem Vektor eine WR-Resistenz vermittelnde Sequenz befindet, konnte auf Parasiten, die das Plasmid aufgenommen hatten, selektiert werden und über die dauerhafte Gabe von WR sichergestellt werden, dass es an die Tochtermerozoiten weitergegeben wird.

3.3.4 Die einzelnen GDV1 Varianten haben unterschiedlichen Einfluss auf die sexuellen Konversionsraten des Parasiten

Als erstes sollte überprüft werden, ob die GDV1 Varianten einen Effekt auf die Gametozytogenese haben. Hierfür wurde über Commitment-Assays die Entwicklung von Gametozyten beobachtet.

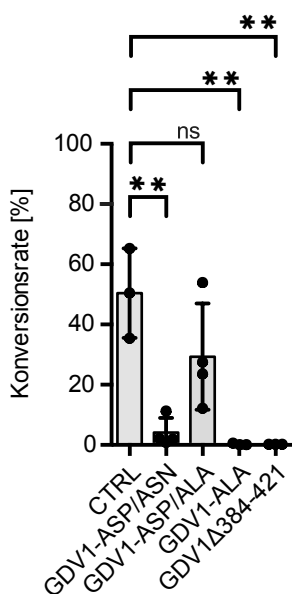


Abbildung 44 Sexuelle Konversionsraten der 3D7-KO Linien und episomal exprimierten GDV1 Varianten. Verglichen werden 3D7 Parasiten, die eine WT Variante des GDV1 episomal exprimieren

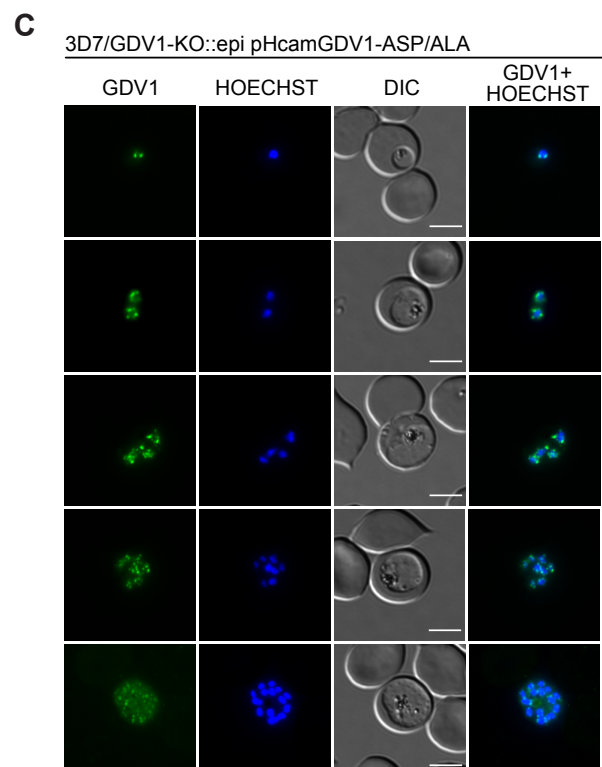
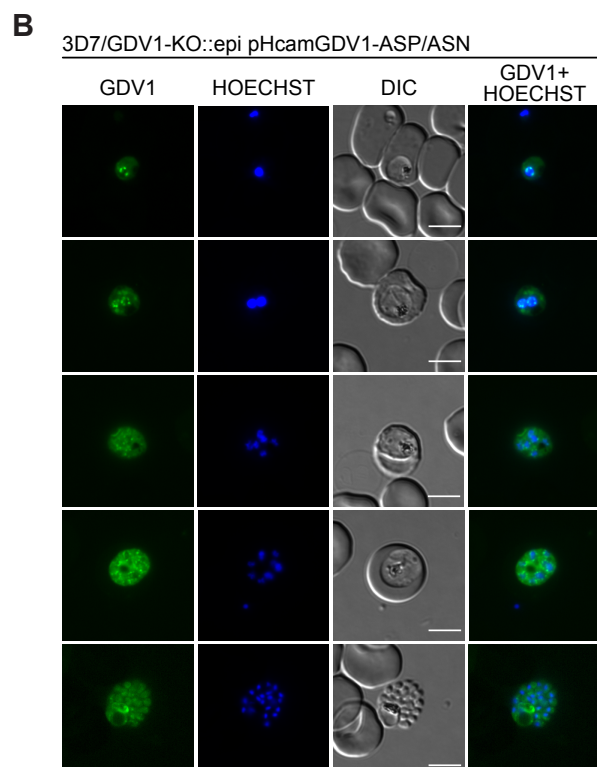
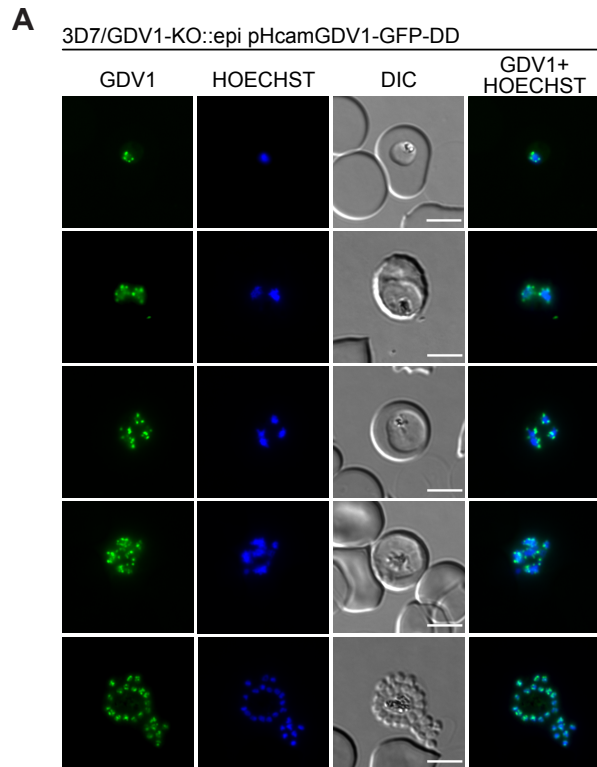
(CTRL), mit 3D7-KO Parasiten, die jeweils eine Variante der GDV1mut-GFP-DD Varianten episomal exprimieren. Die Expression von GDV1 wurde durch die Gabe von Shield-1 induziert. Konversionsraten wurden als Quotient der Anzahl von Parasiten von Tag 7 und Tag 2 nach der Reinvasion anhand von Giemsa-gefärbten Ausstrichen bestimmt. Die dargestellten Daten entsprechen drei (GDV1-ALA und GDV1 Δ 384-421) bzw. vier (CTRL (GDV1-GFP-DD), GDV1-ASP/ASN und GDV1-ASP/ALA) unabhängigen Experimenten. Je Datenpunkt wurden min. 3000 Erythrozyten gezählt. Signifikanzanalyse wurde mittels ungepaartem t-test (two-tailed; * $p > 0,05$) durchgeführt.

Für die Kontroll-Linie, die das *gdv1* WT-Gen episomal exprimierte, konnte im Mittel eine Konversionsrate von ~ 50% ermittelt werden (Abbildung 44). Dieses Ergebnis geht mit den Werten der 3D7-iGP Linie, die GDV1-GFP-DD Expressionskassette endogen im *cg6* Locus integriert hat, einher (32). Im Gegensatz zur 3D7-iGP wird in der 3D7/GDV1-KO::epi pHcamGDV1-GFP-DD das Commitment nur durch das episomal exprimierte GDV1 getriggert, da es kein endogenes GDV1 exprimieren kann. Der Austausch der vier Asp gegen Ala sorgte für vollständigen Verlust der Fähigkeit Gametozyten zu produzieren. Ähnliche Ergebnisse zeigt die Deletion der putativen PIN-Domäne, die im Durchschnitt eine Konversionsrate von 0,2% hatten (Abbildung 44). Eine höhere Streuung der Einzelwerte konnte bei beiden Linien, bei denen entweder je zwei Aminosäuren gegen Ala bzw. gegen Asn ausgetauscht wurden, beobachtet werden (Abbildung 44). Durch den Austausch von Asp gegen Ala waren im Durchschnitt noch ~ 29% der Parasiten in der Lage Gametozyten zu bilden, was keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontroll-Linie bedeutet. Der Austausch gegen Asn hatte dagegen einen stärkeren Effekt und die Konversionsraten lagen im Durchschnitt bei ~ 3,5%. Da bei diesen beiden GDV1mut Varianten, durch den Austausch von nur zwei Aminosäuren zu erwarten ist, dass das Protein weiterhin korrekt gefaltet ist, scheint der Austausch an den Stellen 408 und 410 im Protein einen Einfluss auf die Funktion des Proteins zu haben. Ebenso dafür spricht, dass aufgrund der biochemischen Eigenschaften von Ala und Asn im Vergleich zu Asp, der Austausch gegen Ala einen größeren Effekt haben sollte. Dies ist darin begründet, dass es sich bei Ala um eine ungeladene und unpolare Aminosäure handelt, hierdurch ist keine ladungsabhängige Wechselwirkung und katalytische Aktivität an dieser Position mehr möglich. Asn hingegen ist strukturell ähnlicher zur Asp und die Polarität und Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbindung bleibt erhalten, da es eine Amid-Gruppe in der Seitenkette enthält, daher sollte der Effekt auf die Funktion hier geringer ausgeprägt sein.

3.3.5 Die Lokalisation der GDV1 Varianten ist nicht auf den Nucleus beschränkt

Nachdem ein Effekt auf die Funktion bzw. die Fähigkeit der Parasiten zur Gametozytogenese für die vier GDV1mut Varianten festgestellt werden konnte, wurde

untersucht, ob die verschiedenen Varianten weiterhin im Nucleus lokalisieren. Hierfür wurden bei den vier GDV1mut Linien und der Kontroll-Linie durch die Gabe von Shield-1 die Expression von GDV1 induziert und die Lokalisation des Proteins über einkernige Trophozoiten bis hin zu mehrkernigen Schizonten/Segmentern beobachtet (Abbildung 45).



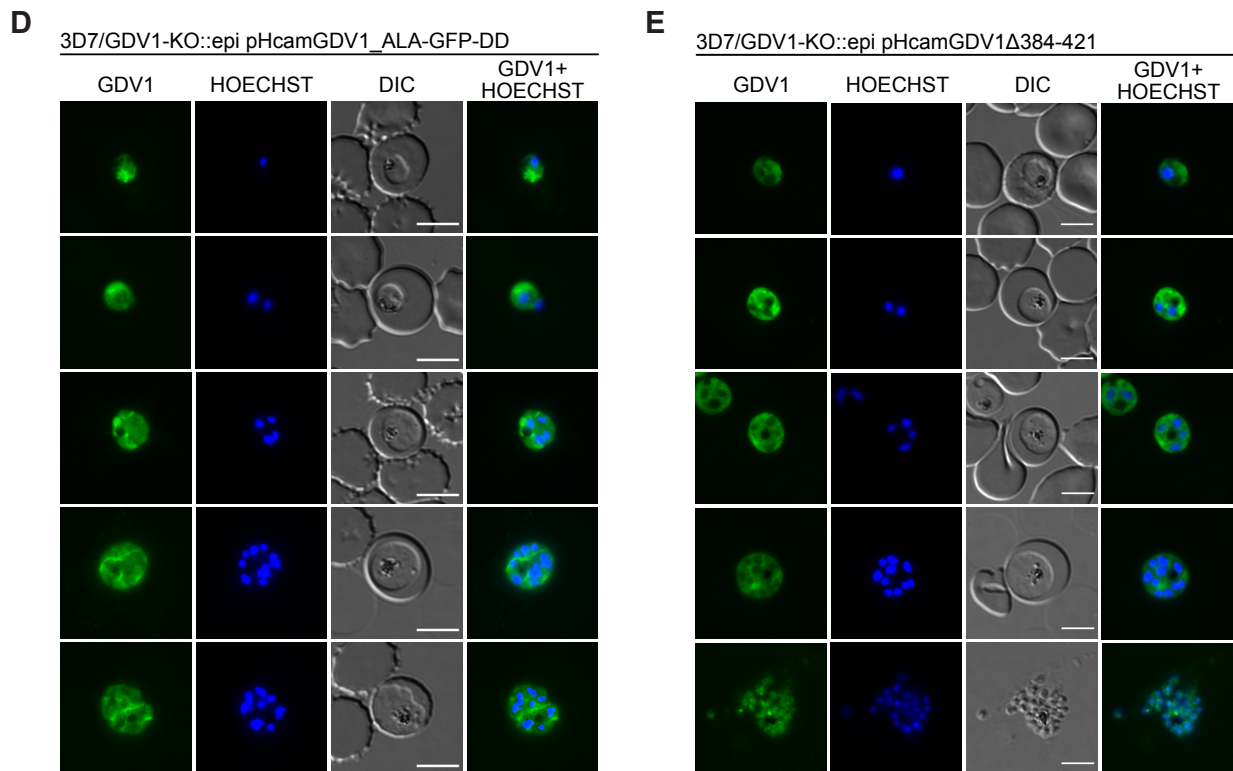


Abbildung 45 Lokalisation der GDV1 Varianten während der einzelnen Blutstadien. (A-E) Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie von 3D7-KO Parasiten, die nach Gabe von Shield-1 die einzelnen GDV1mut-GFP-DD Varianten episomal exprimieren. Dargestellt ist die Lokalisation von GDV1mut-GFP-DD in Ringen (1 Nucleus); Trophozoiten (2 und 4 Nuclei) und Schizonten (<8 Nuclei). Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt. Maßstab= 5 mm.

Die Kontroll-Linie zeigte wie erwartet in Trophozoiten eine Lokalisation als klare Punkte im Nucleus rund um die DNA, die in späteren Stadien etwas diffuser und cytosolischer erscheint (Abbildung 45 A). Hier ließ sich schon ein Unterschied zu den beiden Linien bei denen jeweils zwei Aminosäuren ausgetauscht wurden feststellen, bei der über alle Stadien hinweg zusätzlich zur Lokalisation im Kern eine cytosolische Lokalisation festzustellen war (Abbildung 45 B und C). Allerdings war für GDV1-ASP/ASN das Signal im Nucleus weniger deutlich von dem im Cytosol abgehoben als bei dem eher schwächer wirkenden cytosolischen Signal im Vergleich zum Nucleus von GDV1-ASP/ALA. Im Gegensatz dazu ist bei GDV1-ALA und GDV1 Δ 384-421 keine Lokalisation des GFP-Signals im Nucleus zu sehen, hier ist das Signal nahezu ausschließlich im Cytosol erkennbar (Abbildung 45 D und E). Die Ergebnisse spiegeln die Werte der Konversionsraten wider, insofern GDV1 nur seine Funktion erfüllen kann, wenn es im Kern lokalisiert ist. Eigentlich wäre zu erwarten gewesen, dass die GDV1mut Varianten trotz der Modifikationen im Kern lokalisieren, da die Sequenz die zum Transport des Proteins in den Nukleus führt (281) außerhalb der modifizierten Aminosäuren bzw. entfernten Sequenz liegt. Daher lässt sich weiterhin nicht ausschließen, dass die Modifikation des GDV1 durch Fehlfaltung zum Funktionsverlust führt.

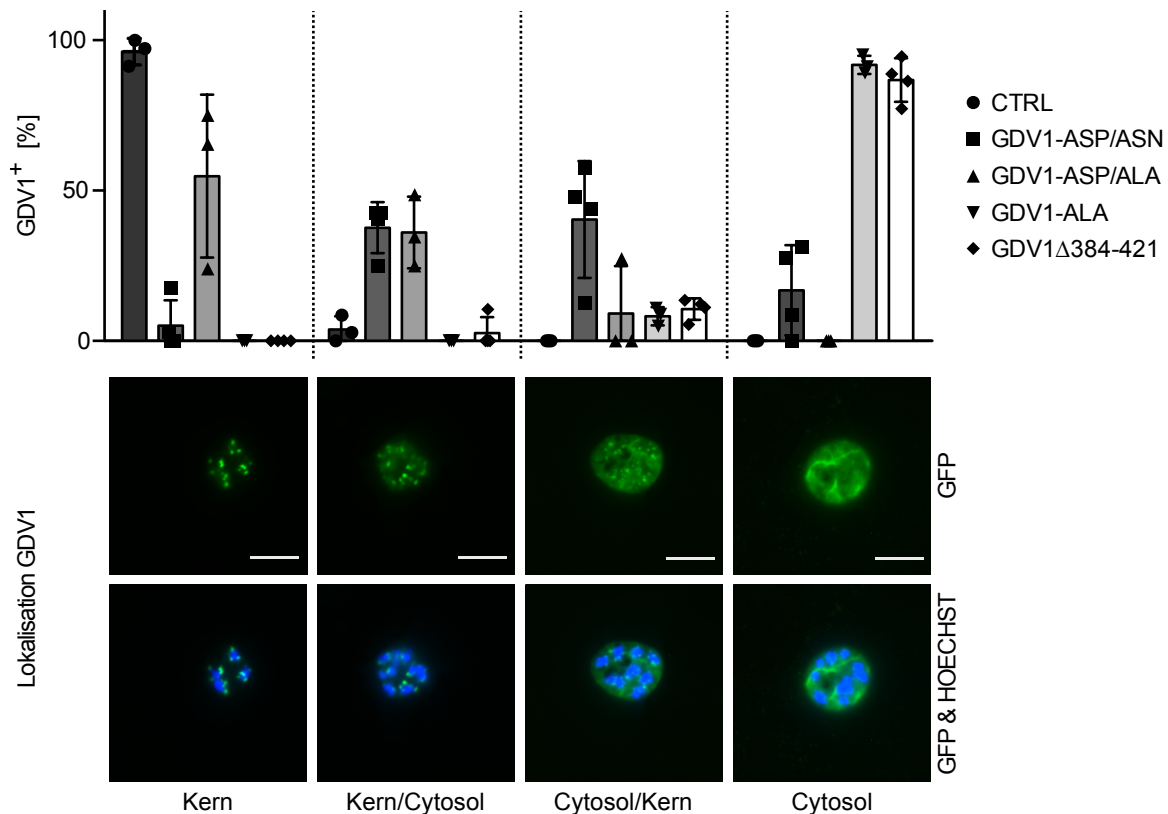


Abbildung 46 Verteilung des GFP-Signals in den GDV1mut Linien. Die ausgezählten Parasiten wurden anhand der Verteilung und Lokalisation des GFP-Signals in vier Kategorien eingeteilt (Beispiele hierfür unter dem Diagramm dargestellt; Lebenszell-Fluoreszenzmikroskopie; Nuclei mit Hoechst angefärbt; Maßstab = 5 mm). Anschließend wurden sie in % aller gezählten Parasiten der jeweiligen Linie in der zugewiesenen Kategorie dargestellt. Die Daten entsprechen drei (CTRL (GDV1-GFP-DD), GDV1-ASP/ALA und GDV1-ALA) bzw. vier (GDV1-ASP/ASN und GDV1Δ384-421) unabhängigen Experimenten. Pro Linie wurden min. 250 Parasiten gezählt.

Zur Quantifizierung der Lokalisation des episomal exprimierten GDV1 und der GDV1mut Varianten in den Parasiten der einzelnen Linien, wurde die Verteilung des GFP-Signals in vier unterschiedliche Kategorien eingeteilt (Abbildung 46). In die erste Kategorie fielen die Parasiten, bei denen das Signal ausschließlich auf den Kern beschränkt gewesen ist und punktiert mit dem Hoechst-Signal colokalisierte. In der zweiten Kategorie war das Signal noch deutlich Kern-lokalisiert, zusätzlich war aber auch ein schwaches cytosolisches Signal erkennbar. In die dritte Kategorie wurden Parasiten gezählt, dessen GFP-Signal stärker im Cytosol als im Kern bzw. gleich stark erkennbar gewesen ist. Parasiten mit einem rein cytosolischen Signal gehörten zur letzten Kategorie. Wie erwartet lokalisierte das GDV1 der CTRL in ~96% der Parasiten im Kern (Abbildung 46). Ähnlich eindeutig war die Lokalisation des GFP-Signals der GDV1-ALA und GDV1Δ384-421 Parasiten mit rein cytosolischer Lokalisation in ~92% und ~87% der ausgezählten Parasiten (Abbildung 46). Für beide Linien ließen sich nur ~8% und ~10% der Parasiten

in die dritte Kategorie einteilen und in der zweiten Kategorie waren dann nur noch ~3% der GDV1 Δ 384-421 zu finden. Bei Bestimmung der Konversionsraten der einzelnen Linien, wurden für die CTRL Parasiten Raten von ~50% berechnet, was nahe an den zuvor publizierten Werten liegt (Abbildung 45)(103). Für die anderen beiden Linien konnte mit ~0,6% (GDV1-ALA) und 0% (GDV1 Δ 384-421) nahezu kein sexuelles Commitment der Parasiten festgestellt werden (Abbildung 45). Die Parasiten der Linien GDV1-ASP/ASN ließen sich zu unterschiedlichen Anteilen in allen vier Kategorien wiederfinden, wobei ~78% der Parasiten in die zweite und dritte Kategorie gezählt wurden (Abbildung 46). Mit einem Anteil von ~55% lokalisierte in mehr als der Hälfte der GDV1-ASP/ALA Parasiten das GDV1 im Kern, die restlichen 45% wurden in Kategorie 2 (~36%) und 3 (~9%) eingeteilt (Abbildung 46). Aus den Daten lässt sich eine deutliche Korrelation zwischen der Lokalisation des GDV1 im Nucleus und den Konversionsraten der einzelnen Linien erkennen. Auffällig ist jedoch, dass die Parasiten der GDV1 Δ 384-421 Linie obwohl in ~13% der Parasiten neben dem cytosolischen Signal noch ein Signal im Nucleus festgestellt werden konnte, kein sexuelles Commitment mehr induziert werden konnte (Abbildung 47 A und B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass nicht nur die Mislokalisierung des Proteins, sondern auch die entfernte Domäne eine Rolle bei der Interaktion des GDV1 mit dem Heterochromatin spielt.

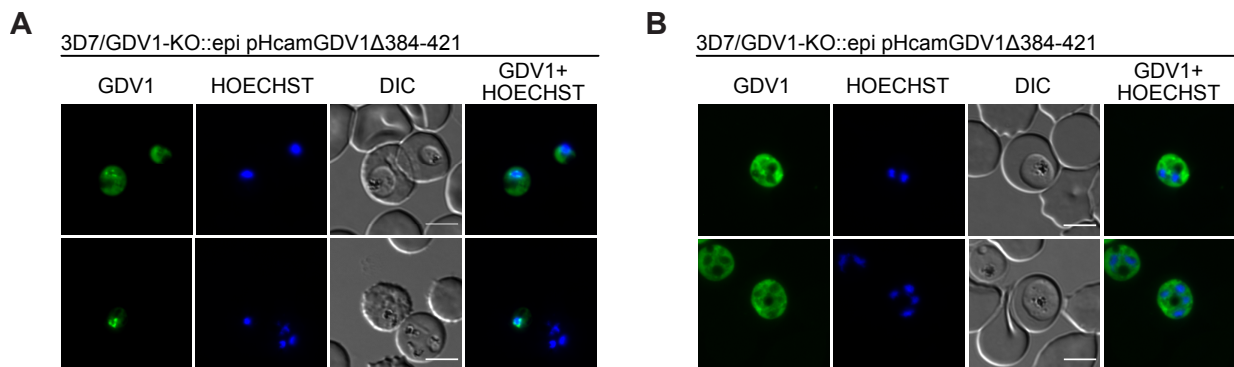


Abbildung 47 Kern-assoziierte und rein cytosolische Lokalisation von GDV1 Δ 384-421. Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie von 3D7-KO Parasiten, die nach Gabe von Shield-1 GDV1 Δ 384-421 episomal exprimieren. Dargestellt sind Beispiele für (A) die Cytosol/Kern und (B) die rein cytosolische Lokalisation). Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt. Maßstab= 5 μ m.

4 Diskussion

Die Invasion von Erythrozyten des humanen Zwischenwirts durch Merozoiten gehört zu einem der essentiellen Schritte während der Entwicklung von *P. falciparum*. Dies gilt sowohl innerhalb des asexuellen Zyklus als auch während der sexuellen Konversion zu Gametozyten (60). Der zeitliche Ablauf des Invasionsprozesses ist inzwischen hinlänglich aufgeklärt, jedoch sind viele der molekularen Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszelle und die Rolle einzelner Proteine hierbei noch nicht vollständig verstanden (59). Zudem ist bekannt, dass neben einer Reihe von essentiellen, hoch konservierten Interaktionen, auch nicht-essentiellen und redundanten Interaktionen stattfinden (57). So wird der initiale Kontakt zwischen Erythrozyt und Merozoit durch Interaktion von MSP-, SEMA- und MSP-ähnlichen Proteinen und der Oberfläche des Erythrozyten gesteuert (61). Aufgrund seiner hohen Abundanz an der Oberfläche des Merozoiten, wurde MSP-1 eine wichtige Rolle zugeschrieben. Untersuchungen haben aber gezeigt, dass MSP-1 nicht notwendig für die Invasion ist, somit ist nicht endgültig geklärt ob und welche MSPs an dem initialen Kontakt beteiligt sind (68). Für den Prozess der darauf folgenden Anheftung hingegen ist bekannt, dass hieran zwei Familien von Adhesinen beteiligt sind, die EBL- und Rh-Proteine (59). Während die meisten dieser Proteine alleine nicht-essentiell für die Invasion sind, so sind sie es allerdings in ihrer Gesamtfunktion (175).

Eine Ausnahme bildet Rh5, welches im Komplex mit CyRPA und Ripr, einen essentiellen Schritt über die Bindung an Basigin steuert (302). Ebenso wie noch nicht alle an der Invasion beteiligten Proteine identifiziert werden konnten, sind viele der Ligand-Rezeptor Interaktionen noch nicht vollständig charakterisiert und viele der Rezeptoren der EBL- und Rh-Proteine sind derzeit noch nicht bekannt (61). Obwohl noch nicht alle Rezeptoren bekannt sind, können generell zwei unterschiedliche Invasionswege unterschieden werden: ein Sialinsäure-abhängiger, der hauptsächlich die Beteiligung der EBL-Proteine verlangt und der Sialinsäure-unabhängige, der hauptsächlich von den Rh-Proteinen gesteuert wird (213). Die beiden Invasionswege können von den unterschiedlichen *P. falciparum* Linien durch die Nutzung verschiedener Rezeptoren an der Oberfläche der Erythrozyten genutzt werden. Hierbei sind manche Linien in der Lage beide Wege gleichermaßen zu nutzen während andere abhängig von einem der Wege sind. So ist die Invasion der 3D7 Parasiten Sialinsäure-abhängig, Parasiten der klonalen Dd2 und W2mef Linien aber in der Lage beide Wege zu nutzen (117).

Der Wechsel zwischen den beiden Invasionswegen ist nur möglich, da der Parasit in der Lage ist durch Regulation der Transkription bestimmte Gene zu erhöhen, in diesem speziellen Fall vier *rh* und zwei *eba* Gene (208). Die Expression dieser Invasionsliganden

ermöglicht nun eine Interaktion mit der Oberfläche von Erythrozyten an denen sich keine Sialinsäurereste befinden (117). Die Nutzung unterschiedlicher Invasionswege, ist ein Beispiel dafür, dass die Expression der Proteine während des Entwicklungszyklus nicht nur einer strengen Stadien-spezifischen Regulation unterliegt sondern teilweise auch eine epigenetisch gesteuerte Unterdrückung der Transkription nicht-essentieller Gene stattfindet (266). Durch epigenetische Steuerung der Transkription, ist der Parasit in der Lage seine phänotypischen Merkmale zu variieren, ohne dass sich hierfür das Genom verändert. Die Variabilität wird ausschließlich durch eine reversible Veränderung der Chromatinarchitektur und somit Zugänglichkeit der Gene für die Transkription erreicht (15). Da diese Art der Regulation eine hohe genomische Plastizität des Parasiten zur Folge hat, ist sie bei fast jedem biologischen Prozess von *P. falciparum* zu finden und ist daher nicht nur ein grundlegender Mechanismus zur raschen Adaption an wechselnde Umweltbedingungen, sondern ebenso wichtig zur Kontrolle zahlreicher überlebenswichtiger Prozesse, insbesondere der Invasion und der sexuellen Differenzierung (58, 192).

Die Fähigkeit des Parasiten sich an veränderte Bedingungen zu adaptieren, führt zusätzlich zur Entstehung und Verbreitung von Resistenzen gegenüber vorhandenen Medikamenten und Impfstoffen, weshalb die Malaria global weiterhin als Bedrohung für die Gesundheit bestehen bleiben wird (214). Der komplexe Lebenszyklus von *Plasmodium* bietet eine Vielzahl von möglichen Angriffspunkten zur Entwicklung prophylaktisch und therapeutisch wirksamer Stoffe (86). Daher bildet ein besseres und detaillierteres Verständnis der Biologie des Parasiten eine der wichtigsten Grundlagen für die Identifizierung neuer potentieller Kandidaten. Daher wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die drei Proteine CyRPA, DBLMSP2 und GDV1 und deren Rolle während der intra-erythrozytären Entwicklung des Parasiten gelegt.

4.1 Die Rolle der putativen Lektin-Bindestelle und ASP-Box von CyRPA während der Invasion von humanen Erythrozyten

Die Ausbildung eines Komplexes bestehend aus den Proteinen CyRPA, Ripr und Rh5 stellt einen essentiell notwendigen Schritt während der Invasion von *P. falciparum* dar (302). Zudem konnte in neuesten Studien gezeigt werden, dass für die Funktionalität des Komplexes die Bindung von Ripr an CSS und PTRAMP unerlässlich sind, und für die Verankerung an der Oberfläche des Merozoiten sorgen (96, 235). Die Interaktion von Rh5 mit dem Rezeptor Basigin löst eine irreversible Bindung aus und die folgende Ausbildung der *Tight Junction* gefolgt von der endgültigen Invasion (63, 119). Es wird vermutet, dass die Ausbildung des Komplexes zum einen einen apikalen Ca^{2+} -Flux zu triggern scheint und zum anderen die andauernde, starke Deformation der Oberfläche eine Plattform für

die Bindung des Merozoiten darstellt (119, 307). Interessanterweise scheint die Bindung an den Rezeptor Basigin und der Ca^{2+} -Flux eine Signalkaskade auszulösen, die in der Ausbildung der Ringform des Parasiten resultiert (307).

Bisherige Studien weisen darauf hin, dass CyRPA innerhalb des Komplexes als Protein-Protein-Bindungsplattform zwischen Ripr und Rh5 fungiert (302). Zudem sind die beiden Proteine Ripr und CyRPA hochkonserviert in den meisten *Plasmodium* Spezies, wobei im Genom Nagetier infizierender Arten, wie *P. berghei*, keine Orthologen von CyRPA zu finden sind (138). Allerdings ist Rh5, dessen Bindung an den humanen Rezeptor Basigin essentiell für die Invasion von *P. falciparum* ist, nur in den nahe verwandten *Laverania* Spezies zu finden (63). Nachdem gezeigt werden konnte, dass Rh5 eine geringere Affinität zur Bindung von Schimpansen Basigin als dem humanen Basigin aufweist, wurde vermutet, dass die Anpassung an den humanen Rezeptor der Grund für den Wechsel zum humanen Wirt und den späteren Wirtstropismus von *P. falciparum* ist (107, 306). Inzwischen wird diese Hypothese aus verschiedenen Gründen bezweifelt (222, 268). In Untersuchungen ließ sich in *P. knowlesi* die Bildung eines Komplexes zwischen Ripr, PTRAMP und CSS nachweisen, aber keine Interaktion mit CyRPA. Trotzdem ist CyRPA dort notwendig für eine erfolgreiche Invasion (157). Neben der Aufklärung der Struktur von CyRPA, wodurch sich nachweisen ließ, dass CyRPA eine Form annimmt, die der katalytischen Domäne einer Sialidase ähnelt (101), konnte eine ASP-Box als Sialidase Motif identifiziert werden (82). Allerdings konnte aufgrund fehlender katalytisch aktiver Reste keine Sialidase-Aktivität nachgewiesen werden (101). Folglich lässt sich vermuten, dass die Funktion des Proteins innerhalb des Komplexes vielfältiger ist als bisher angenommen. Bestärkend kommt hinzu, dass die Bindung eines Komplexes aus Rh5 und CyRPA an der Oberfläche von Erythrozyten effizienter ist, als die von Rh5 alleine (302). Somit ist eine direkte Interaktion von CyRPA mit der Oberfläche des Erythrozyten wahrscheinlich.

Die im Vorfeld dieser Arbeit von den Kollaborationspartnern an der Griffith University (Queensland, Australien) und dem Swiss TPH (Basel, Schweiz) durchgeführten Experimente und deren Ergebnisse sind Grundlage der hier erreichten Ergebnisse. Unter anderem wurden Bindestudien durchgeführt, bei denen eine hohe Affinität von rekombinant exprimiertem CyRPA für Glykane mit endständiger Neuraminsäure nachgewiesen werden konnte. Was ein Hinweis darauf ist, dass es sich hierbei um einen möglichen Bindungspartner handelt und CyRPA über eine Lektin-Aktivität verfügt und somit zur Gruppe der Glykan-bindenden Proteine gehört (69). Sialinsäuren, zu denen auch die Derivate der Neuraminsäuren gehören, sind in mit hoher Abundanz auf der Oberfläche aller Zelltypen und insbesondere auch Erythrozyten zu finden (294).

Außerdem ist eine Reihe membranständiger Glykoproteine bekannt, die eine Sialinsäure als endständigen Zucker haben und *Plasmodium* als Invasionsliganden dienen. Hierzu gehören unter anderem die Glycophorine A, B und C mit sowohl N- als auch O-gebundenen Glykanen, die als Rezeptoren für EBA-175, EBL-1 und EBA-140 im Sialinsäure-abhängigen Invasionsweg dienen. Im Gegensatz dazu sind Basigin und Complement receptor 1 (CR1) Sialinsäure-unabhängige Rezeptoren für Rh5 und Rh4 (63, 180, 187, 188, 215, 275, 276).

Nachdem die Affinität von CyRPA zur Bindung von Glykanen nachgewiesen wurde, konnten als mögliche hieran beteiligte Bereiche neben der ASP-Box in der 201-SHDKGETWG-209 Schleife, zwei potentielle Lektin-Bindestellen, deren katalytisch aktive Reste innerhalb der zweiten und dritten Schleife des Proteins lokalisiert sind, durch *in silico* Modellierung identifiziert werden (Abbildung 10)(69). Daher wurde von den Kollaborationspartnern die Hypothese aufgestellt, dass eine CyRPA-vermittelte Bindung an die Erythrozyten-Oberfläche Sialinsäure-abhängig ist, da diese durch Sialidase Behandlung unterbunden werden konnte. Aufbauend auf diese *in vitro* Daten, liefern die Ergebnisse dieser Arbeit weitere Hinweise auf eine für die Invasion notwendige Interaktion mit einem Rezeptor an der Oberfläche des Erythrozyten. Mit Hilfe transgener *P. falciparum* 3D7 Parasiten, die über ein CRIPSR/Cas9 kombiniertes DiCre Rekombinase System auf Basis, der *in vitro* Daten generiert wurden, konnte durch induzierte Exzision der Zielsequenz konditional unterschiedliche CyRPA Varianten exprimiert werden und die Lektin-Aktivität und die daraus folgende Bindung von Sialinsäure untersucht werden. Zugrunde gelegt wurde eine präzise Analyse der Auswirkungen von Punktmutationen auf die Parasitenproliferation und im Besonderen auf die Re-Invasion nicht-infizierter Erythrozyten.

4.1.1 Die putative Lektin-Bindestelle und die ASP-Box von CyRPA sind trotz fehlender Sialidase-Aktivität notwendig für eine effiziente Invasion

Ein induzierter konditionaler Knockdown von CyRPA führt dazu, dass Merozoiten weiterhin in der Lage sind an der Oberfläche von Erythrozyten anzuheften und auch eine starke Deformierung ist weiterhin möglich, allerdings bleibt die Bindung reversibel und es kommt nicht zur Invasion (302). Hieraus lässt sich schließen, dass die Ausbildung des Komplexes zwischen CyRPA, Ripr und Rh5 essentiell für die irreversible Bindung und die folgende Invasion ist. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen außerdem, dass nicht nur die Ausbildung des Komplexes notwendig ist, sondern dass neben der Bindung von Rh5 an Basigin auch die Interaktion von CyRPA mit der Erythrozyten-Oberfläche notwendig für eine effiziente Invasion ist (Abschnitt 3.1.4). Das

Einführen von Punktmutationen innerhalb der putativen Lektin-Bindestelle und der ASP-Box durch induzierbare Exzision im Genom führte zu einer signifikanten Verringerung der Proliferation über die Dauer von drei Zyklen zwischen 45 und 85% im Vergleich zur Kontroll-Linie (Abbildung 22, 23 und 24). Für die putative Lektin-Bindestelle wurden zuvor Glykan-Bindestudien mit rekombinant exprimierten CyRPA Varianten durchgeführt, die korrespondierend mit den induzierbaren Punktmutationen an Stelle der potentiell funktionalen Aminosäuren ein Alanin haben (69). Einhergehend mit diesen Ergebnissen zeigte sich *in vivo* die stärkste Inhibierung der Proliferation von etwa 80% bei der Variante CyRPA-E148-A-3xHA, welche *in vitro* keine Bindung an α 2-6-SLN-Ac zeigt, weder bei dem monomeren α -2,6-SLN-Ac noch bei einem biantennären Glykan mit zwei endständig gebundenen α -2,6-SLN-Ac (α -2,6-Biant-Ac) (Abbildung 10 und 20). Ebenso spiegelte sich dieses Ergebnis in einer signifikant niedrigeren Invasionsrate wider, womit nachgewiesen werden konnte, dass eine weniger effiziente Re-Invasion der Grund für die verringerte Proliferation war.

Eine ähnliche Übereinstimmung zu den vorherigen *in vitro* Daten zeigten der Austausch der Aminosäure an Position 149, 152 und 155 auf die Proliferation (Abbildung 21). Hier ließen sich *in vitro* unterschiedlich starke Effekte auf die Bindungsfähigkeit zu α -2,6-Biant-Ac feststellen (Abbildung 10). Im Gegensatz zu gering signifikanten Unterschieden in der Proliferation beim Austausch der Aminosäuren 149 und 152 ließ sich kein signifikanter Unterschied der Invasionsraten nachweisen, allerdings zeigten die einzelnen Experimente eine hohe Streuung der Einzelwerte wodurch eine sichere statistische Analyse und Bestimmung der Signifikanz nicht möglich war (Abbildung 22 C und 23 A). Andererseits lässt die hohe Streuung auf einen geringer ausgeprägten und somit kompensierbaren Effekt auf die Bindungsfähigkeit schließen, als für den Austausch der Aminosäure an Position 148 gezeigt werden konnte. Der *in vitro* nachgewiesene, relativ geringe Effekt der ausgetauschten Aminosäure an Position 155, ließ sich *in vivo* durch einen nicht signifikanten Effekt auf Proliferation und Invasion bestätigen. Signifikante Effekte durch den Austausch der Aminosäuren an Position 209 und innerhalb der ASP-Box an Position 201 und 205 wurden sowohl durch eine verringerte Proliferation als auch durch eine geringere Invasionsrate nachgewiesen (Abbildung 21, 23 und 24). Diese Ergebnisse folgen nicht den *in vitro* durchgeführten Bindestudien, da hier nur ein sehr geringer Effekt im Gegensatz zu den anderen Mutationen beobachtet wurde (69).

Es lässt sich auch ausschließen, dass durch das Einführen einer Punktmutation die Ausbildung des Komplexes zwischen CyRPA, Ripr und Rh5 unterbunden wird, wie es bei einem konditionalen Knockout von CyRPA bzw. einem der anderen Komplex-Proteine der Fall wäre. Die Bindestellen für Rh5 und Ripr liegen im vierten und fünften bzw.

sechsten Flügel von CyRPA (313). Da keine Überlappung der relevanten Bereiche und Aminosäuren für die Interaktion mit Rh5 und Ripr mit den dicht beieinander liegenden Lektin-Bindestelle (dritter Flügel) und ASP-Box (vierter Flügel) vorhanden ist, ist die Ausbildung des Komplexes möglich. Daher ist der Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren auf die Invasion des Parasiten *in vivo* nicht auf ein Fehlen des Komplexes zurückzuführen, sondern es handelt sich um einen Effekt auf die Funktion von CyRPA abseits der Komplexbildung. Neben der Störung der Komplex-Bildung wäre durch die Modifikation ebenso eine Fehlfaltung und somit Fehlfunktion des Proteins möglich gewesen. Mittels IFA wurden die Expression und Lokalisation der einzelnen CyRPA Varianten nachgewiesen und es wurde ein mit zuvor publizierten Daten vergleichbares Lokalisations-Muster gefunden (82, 302). Folglich ist von einer korrekten Prozessierung, Faltung und anschließender Lokalisierung des Proteins am apikalen Ende des Merozoiten auszugehen. Ebenfalls wurde so ein möglicher Effekt des 3xHA-tags auf die Funktion des Proteins ausgeschlossen. Auch der Nachweis der einzelnen Varianten ist durch die Bindung des mAK C10 möglich, welche durch Regionen in Flügel 1 und 6 vermittelt wird (Abbildung 19). Der mAK C10 wurde in einer vorangegangenen Studie zusammen mit einer Reihe anderer inhibierender und nicht-inhibierender α -CyRPA AK untersucht (82). Um die Epitope der einzelnen AK an der Oberfläche von CyRPA zu bestimmen, wurde dort die Bindefähigkeit an unterschiedliche Fragmente des Proteins überprüft. Im Gegensatz zu allen anderen AK konnte der C10 AK nur eines der Fragmente binden, welches nahezu dem vollständigen Protein entsprach. Daher wurde davon ausgegangen, dass sich das für die Bindung wichtige Epitop über den ersten und sechsten Flügel verteilt. Eine Bindung an ein Epitop in nur einem der beiden Flügel wurde hierdurch ebenso ausgeschlossen, woraus sich folgen lässt, dass es sich um ein Epitop handelt, welches nur zugänglich ist, wenn das Protein in der richtigen Konformation vorliegt (82). Durch eine Kolo-kalisation von α -HA und C10 konnte neben der richtigen Konformation der Proteine auch die Expression der modifizierten Form der Proteine bestätigt werden (Abbildung 19 und 20).

Ebenfalls sind die Ergebnisse, wie zu erwarten nicht auf eine Störung des Egress zurückführbar, da bei keiner der Linien ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontroll-Linie beobachtet werden konnte (Abbildung 22 und 23). Durch die Bestimmung der Egress-Raten konnte gleichzeitig ein negativer Effekt der Behandlung mit Rapalog und eine mögliche fehlerhafte Aktivität der CyRPA Varianten bis zum Zeitpunkt des Egress ausgeschossen werden.

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Ergebnisse den Schluss zu, dass die Lektin-Aktivität von CyRPA nicht essentiell für eine erfolgreiche Invasion der Erythrozyten ist, aber eine effizientere Invasion ermöglicht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass im

Gegensatz zu rekombinant exprimierten CyRPA auch die Reste der ASP-Box innerhalb der 201-SHDKGETWG-209 Schleife wichtig für die Funktion von CyRPA sind.

Eine Hypothese für das Zusammenwirken von CyRPA und Rh5 während der Invasion besteht darin, dass CyRPA die Bindung von Rh5 an Basigin verstärkt und infolgedessen die Effizienz der Invasion erhöht ist (302). Die stärkere Bindung von Rh5 an Basigin in Anwesenheit von CyRPA könnte unter anderem darin begründet sein, dass Rh5 durch die Bindung an CyRPA eine Konformationsänderung erfährt, die eine Bindung an Basigin begünstigt. Die Bindung von Rh5 an Basigin erfolgt zum einen über eine N-terminale Domäne des Rezeptors und eine Schleife an der Spitze von Rh5, die hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert ist und zum anderen über eine flexible Bindung mit dem C-terminus (315). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass bei Rh5 sowohl im Komplex mit CyRPA als auch der alleinigen Interaktion mit Basigin, keine Unterschiede in der Konformation erkennbar sind (96). Daher deutet dies eher darauf hin, dass nicht eine Konformationsänderung der Grund für die stärkere Bindung ist. Eine weitere Möglichkeit könnte die zusätzliche Interaktion von CyRPA mit der Oberfläche des Erythrozyten sein. Im Hinblick auf die putative Lektin-Bindestelle, ist es möglich, dass die hierdurch entstehende Affinität von CyRPA zu endständig gebundenen Sialinsäuren an der Oberfläche einen Einfluss auf die Ausrichtung bzw. Nähe des Rh5 zum Rezeptor hat und hierdurch zusätzlich die Bindung verstärkt.

4.1.2 Die Mutation an Position E148 hat keinen Effekt auf eine spezifische Bindung von Neuraminsäuren *in vivo*

Bei Sialinsäuren handelt es sich um Zucker-Derivate der Neuraminsäure, die hauptsächlich als Glykokonjugate in der Glykokalyx von Zellen fast aller Lebensformen, sowohl beim Menschen und anderen Säugetieren als auch bei Pilzen, Algen, Bakterien und Viren, zu finden sind (220, 238). Diese terminalen negativ geladenen hydrophoben Gruppen sind wichtig für die Zellstabilität und Zell-Zell-Interaktionen, außerdem dienen sie als Angriffspunkt für viele Pathogene und Toxine (46, 239, 293). Neuraminsäuren werden in drei Hauptgruppen die 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), die 5-N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und die 2-Keto-Deoxynonulosonsäure (Kdn), die durch Methylierungen, Phosphorylierungen, Sulfatierung und in den meisten Fällen durch O-Acetylierungen modifiziert werden, aufgeteilt (240). Sie können sowohl über α -2,3 oder α -2,6 mit Galaktose oder N-Acetylgalaktosamin oder über α -2,8 bzw. α -2,9 zu Polysialinsäuren über glykosidische Bindungen verbunden sein (195). Neu5Ac kann in Neu5Gc durch Hydroxylierung der Methylgruppe innerhalb der funktionellen Acetylgruppe umgewandelt werden, katalysiert wird diese Reaktion durch die Cytidin

Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure Hydroxylase (CMAH) (245). Ein CMHA codierendes Gen ist Teil des Genoms der meisten Wirbeltiere, wie Reptilien, Amphibien und der meisten Säugetiere, aber auch bei Algen und Bakterien (220). Das humane *CMAH* ist durch den Verlust eines Exons vor etwa 3,2 Mio. Jahren, welches für das aktive Zentrum des Enzyms codiert, funktionslos. Dies führt dazu, dass beim Menschen im Gegensatz zu Menschenaffen nur Neu5Ac an der Oberfläche von Zellen vorhanden ist (52, 144, 203). Bei Schimpansen liegt der Anteil von Neu5Gc bei etwa 75% und es wurde daher vermutet, dass dieser Unterschied in der Verteilung der Sialinsäuren ursächlich für die Wirtsspezifität der *Laverania Plasmodium* Arten ist (184).

Im Fall von *P. falciparum* und *P. reichenowi* konnte gezeigt werden, dass EBA-175 in *P. falciparum* eine Präferenz für Neu5Ac zeigt und zusätzlich Anwesenheit von Neu5Gc diese Bindung stört, während *P. reichenowi* Neu5Gc bevorzugt (183). Da EBA-175 eine nicht-essentielle Rolle während der Invasion spielt und *Laverania* Parasiten trotz intakter CMAH-Gene bei Schimpansen und Gorillas strikten Wirtstropismus zeigen, ist es unwahrscheinlich, dass der Wirtstropismus von *P. falciparum* allein durch die EBL-Proteine bestimmt wird (87, 306). Neben den EBL-Proteinen weist auch rekombinant exprimiertes Rh5 eine hohe Wirtsspezifität auf, zudem wurde festgestellt, dass Rh5 einer positiven Selektion unterliegt (306). Da der Ursprung von *P. falciparum* vermutlich in einem einzelnen Übergang von einem Gorilla auf einen Menschen liegt, ist von großem Interesse, welche Wirt-Parasit-Interaktion dies möglich gemacht hat (178). In diesem Zusammenhang wurde auch die Hypothese aufgestellt, dass die positive Selektion der Rh5 unterliegt diesen Sprung unterstützt haben könnte (107). In einer weiteren global angelegten Studie zu *P. falciparum* zeigte sich, das Serin (S197) in Rh5, welches an der Bindung zu Basigin beteiligt ist und positiver Selektion während der Diversifizierung der *Laverania* unterlegen hat, ein polymorphes Allel ist (222). Während in den afrikanischen Proben alle untersuchten Proben ein Codon für Serin (S197) nachweisbar war, wurde in der Hälfte, der aus Südostasien stammenden, neben dem Serin (S197) auch Tyrosin (Y197) gefunden. Ein Tyrosin ist ebenso in Rh5 von *P. praefalciparum* und *P. adleri* an dieser Position zu finden. Es wurde daher vermutet, dass der Wechsel zu Serin (S197) notwendig für den ersten Übergang auf den Menschen gewesen ist, in der späteren Entwicklung der Polymorphismus jedoch durch kompensatorische Effekte durch Veränderungen des Rh5 oder der anderen Proteine des Invasionskomplexes, zu denen auch CyRPA gehört, ermöglicht wurde (305).

Aufgrund der Möglichkeit, dass eine Veränderung von CyRPA eine Rolle beim Wirtstropismus spielen könnte und auf der Oberfläche von Erythrozyten nur Neu5Ac zu finden ist, wurde die Hypothese überprüft, ob *P. falciparum* CyRPA während der Co-Evolution mit dem humanen Wirt seine Sialin-Spezifität verändert hat. In Versuchen der

Kollaborationspartner mit rekombinant exprimiertem *P. falciparum* CyRPA (*PfCyRPA*) und *P. reichenowi* CyRPA (*PrCyRPA*) konnte nachgewiesen werden, dass *PfCyRPA* eine ~ 50-fach stärkere Bindung an α -2,6-SLN-Ac im Vergleich zu α -2,6-SLN-Gc zeigt und ~ 1000-fach stärker an α -2,6-Neu5Ac als an α -2,6-Neu5Gc bindet (69). Da sich eine eindeutige Präferenz für die Bindung von Neu5Ac *in vitro* nachweisen ließ, wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente mit synthetischen polymeren Neuraminsäuren *in vivo* durchgeführt. Die Inkubation fixierter Parasiten mit Biotin-markierten α -2,6-Neu5Gc (BP-0957) und anschließendem IFA zeigten schwaches, diffuses über die Oberfläche des Parasiten verteiltes Signal mit einigen Foci dicht an den einzelnen Nuclei (Abbildung 26). Im Gegensatz dazu wurde α -2,6-Neu5Ac (BP-0997) in einer gleichmäßigen Verteilung an der Oberfläche des Parasiten gebunden (Abbildung 25). Dies zeigt, dass eine geringere Affinität von *P. falciparum* zur Bindung von α -2,6-Neu5Gc besteht, da im Vergleich zum detektierten Signal von Oberfläche-gebundenem α -2,6-Neu5Ac, die Stärke des detektierten Signals wesentlich geringer gewesen ist. Da in den gezeigten Experimenten keine eindeutige Kollokalisierung von α -2,6-Neu5Gc mit CyRPA möglich war, lässt sich aus den Experimenten nicht schließen, ob α -2,6-Neu5Gc von CyRPA gebunden wird. Einhergehend mit den Ergebnissen für Parasiten, die die Wildtyp Variante von CyRPA exprimieren, waren die Ergebnisse für Parasiten die CyRPA-E148A-3xHA exprimierten ebenfalls nicht eindeutig, da sich auch hier die gleichen Verteilungsmuster bei der Bindung von α -2,6-Neu5Ac und von α -2,6-Neu5Gc feststellen ließen wie beim Wildtyp. Somit lässt sich basierend auf den IFA-Daten keine Aussage darüber treffen, ob der aus der Punktmutation resultierende Phänotyp in einer verringerten Bindefähigkeit des Proteins an Sialinsäuren begründet ist, obwohl das rekombinant exprimierte CyRPA-E148A keine Affinität zur Bindung an Sialinsäuren *in vitro* hat.

Auch ist es nicht überraschend, dass eine Bindung der Neu5Ac gleichmäßig über die Oberfläche des Parasiten verteilt ist, da bei einer Reihe von Invasions-relevanten Proteinen der EBL- und RBL-Familie die Interaktion mit dem zugehörigen Rezeptor an der Oberfläche des Erythrozyten Sialinsäure-abhängig ist und somit diese Proteine eine Affinität zur Interaktion mit Sialinsäuren haben (45). Da die Funktion vieler Oberflächenproteine zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt ist, lässt sich keine Aussage darüber treffen, welche Proteine eine Lektin-Aktivität aufweisen und direkt an Sialinsäuren binden, allerdings ist bekannt, dass zumindest EBA-181 sowohl mit Neu5Ac und Neu5Gc interagiert (305). Im direkten Vergleich der Verteilungsmuster von EBA-181 (127) und der Verteilung der Neu5Gc-Foci zeigt sich das gleiche Muster, um hieraus auf eine Bindung von Neu5Gc an EBA-181 schließen zu können, bleibt es in weiteren Experimenten eine Kollokalisierung nachweisen zu können. Generell ist es in den vielen

Fällen nicht trivial *in vitro* gewonnene Erkenntnisse *in vivo* zu reproduzieren. Während *in vitro* meist die Interaktionen eines Proteins bzw. eines bekannten Komplexes mit definierten Partnern unter idealen Bedingungen untersucht wird, so hat man hierauf *in vivo* keinen Einfluss. Hier kommt dann häufig zum Tragen, dass Proteine in ihrem natürlichen Kontext, einer viel komplexeren Umgebung ausgesetzt sind. Es können weitere Moleküle, Proteine usw. vorhanden sein, die einen Effekt auf die Funktion des Proteins haben. So spiegeln *in vitro* Daten immer wieder, welche Interaktionen für ein Protein potentiell möglich sind, dies bedeutet im Umkehrschluss aber nicht, dass diese Interaktion auch wirklich stattfindet. Dies kann unter anderem daran liegen, dass der notwendige Bereich für die Interaktion nicht zugänglich ist, da das Protein z. B. in einer anderen Konformation vorliegt oder die Affinität *in vivo* nicht stark genug für eine Interaktion ist. Zudem sind in keinem Organismus alle Vorgänge bekannt und dadurch ebenfalls die Nebeneffekte nicht, die hierdurch vorhanden sind.

In Bezug auf die durchgeführten Experimente bedeutet dies, das versucht werden sollte bekannte Nebeneffekte zu minimieren. Hierzu könnte ein KO von EBA-181 gehören, um auszuschließen, dass die Bindung von Neu5Gc durch dieses Protein erfolgt. Außerdem könnten vor der Behandlung mit den synthetischen Neuraminsäuren Antikörper genutzt werden, um andere potentielle Bindungspartner der Neuraminsäuren blockieren. Und nicht zuletzt könnten freie Merozoiten ein weniger undeutliches Ergebnis liefern, da als Bindungspartner nur die Proteine an der Oberfläche zur Verfügung stünden.

4.2 Die Expression von DBLMSP2 unterliegt einer GDV1-abhängigen Regulation

In der Vergangenheit sorgten unterschiedliche Ansatzpunkte dafür, das DBLMSP2 in den Fokus mehrerer Studien gelangte. Hierbei wurde unter anderem der Schwerpunkt auf eine potentielle Rolle von DBLMSP2 bei Medikamentenresistenz und der Entwicklung einer schützenden Immunität bei wiederholter *P. falciparum* Infektion gelegt (51, 274, 291, 292). Die Analyse von Polymorphismus Mustern zeigte, dass *dblmsp2* in einer Reihe von klinischen Isolaten deutlicher balancierender Selektion unterliegt und zudem nur in einer geringen Anzahl von Parasiten exprimiert wird, was zu der Vermutung führte, dass DBLMSP2 einen Effekt auf das Parasitenwachstum in unterschiedlicher Umgebung haben könnte (8, 210). Im Genom von 3D7 liegt *dblmsp2* heterochromatisch vor und ist mit HP1 assoziiert. Zusätzlich wies die Auswertung von Transkriptomanalysen auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von DBLMSP2, GDV1 und sexueller Entwicklung hin (103, 108).

Der Nachweis einer erhöhten Anzahl von *dblmsp2* Transkripten im Kontext der Assoziation mit HP1 und der erhöhten Expression von GDV1, lässt eine Regulation durch

GDV1 bzw. von GDV1-regulierten TFs wie AP2-G vermuten. Allerdings konnte eine erhöhte Transkription von *dblmsp2* auch in Abwesenheit eines funktionalen AP2-G nachgewiesen werden, was für die direkte Regulation durch GDV1 spricht (103). Zusammen mit der Expression des Proteins im späten Schizonten und der Lokalisation an der Oberfläche von Merozoiten wurde basierend auf diesen Daten eine Rolle während der sexuellen Entwicklung und im speziellen der Invasion sexuell determinierter Merozoiten angenommen.

Um ein besseres Verständnis für die Rolle von DBLMSP2 während der Entwicklung des Parasiten zu bekommen, wurde hier mit Hilfe unterschiedlicher Ansätze der Einfluss auf die asexuelle Proliferation und die sexuelle Konversion untersucht. Aufgrund der gemeinsamen strukturellen Besonderheit, wurde DBLMSP1 als weiteres Mitglied der MSP3-ähnlichen Proteine ebenfalls bezüglich eines möglichen Einflusses auf die Entwicklung des Parasiten untersucht (253).

Die im Zusammenhang mit DBLMSP2 in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die Transkription von *dblmsp2* einer GDV1-abhängigen Regulation unterliegt, allerdings konnte hier nicht bestätigt werden, dass DBLMSP2 eine Rolle während der sexuellen Entwicklung spielt. Ebenso konnte keine gemeinsame essentielle Funktion von DBLMSP1 und DBLMSP2 unter Zellkultur-Bedingungen nachgewiesen werden.

4.2.1 DBLMSP2 hat trotz GDV1-abhängiger Expression keinen Effekt auf die sexuelle Entwicklung

Einhergehend mit vorherigen Publikationen konnte die Lokalisation des Proteins an der Oberfläche von späten Schizonten bzw. Merozoiten bestätigt werden (Abbildung 28)(133, 134). Darüber hinaus konnte keine Veränderung der Lokalisation beobachtet werden, nachdem durch Absenken des Cholin-Levels (3D7) bzw. Gabe von Shield-1 (3D7-iGP) sexuelles Commitment induziert wurde. Allerdings konnte eine signifikant höhere Zahl von DBLMSP2 exprimierenden Schizonten festgestellt werden, was wiederum die zuvor publizierte erhöhte Transkription von *dblmsp2* nach Überexpression von GDV1 bestätigt (Abbildung 31 A) (103). Im Widerspruch hierzu steht allerdings, dass ein Auszählen der DBLMSP2⁺ und GDV1⁺ Parasiten eine negative Korrelation ergab, was ein Hinweis darauf ist, dass die Anzahl der DBLMSP2⁺ Parasiten niedriger ist, wenn ein hoher Anteil GDV1⁺ Parasiten vorhanden ist (Abbildung 31 D). Interessanterweise wurden vor kurzem Daten publiziert, laut denen eine positive Korrelation zwischen DBLMSP2 Expression und sexueller Konversion in 3D7 Parasiten gefunden werden konnte (111). Ebenso widerspricht eine negative Korrelation der gefundenen signifikanten

Hochregulation der Transkription, wenn GDV1 überexprimiert wird (Abbildung 31 B) (103). Allerdings werden bei der Berechnung von Korrelationen die Tendenzen zweier Variablen miteinander verglichen und es kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob ein linearer Zusammenhang besteht, was nicht zwingend einen kausalen Zusammenhang voraussetzt. Somit lässt sich trotz negativer Korrelation kein Zusammenhang von erhöhter DBLMSP2 Expression in Folge von GDV1 Expression ausschließen.

Vielmehr konnte durch den funktionalen Knockout von GDV1 nachgewiesen werden, dass in Abwesenheit von GDV1 nahezu kein DBLMSP2 exprimiert wird (Abbildung 33 A). Wie schon beschrieben lässt sich in 3D7 Parasiten mit intaktem *gdv1* Locus, durch das Senken der Cholin Konzentration neben der sexuellen Konversion auch die Expression von DBLMSP2 erhöhen. In der Linie mit GDV1-KO bleibt die Expression nach Senken der Cholin Konzentration aber auf demselben Level, wie zuvor bei hoher Konzentration. Hieraus lässt sich jedoch nicht schließen, dass dies eine direkte Folge der fehlenden Regulation durch GDV1 ist. In dieser Parasitenlinie episomal exprimierte GDV1 führte hingegen zu signifikant höherer Expression von DBLMSP2 (Abbildung 33 B). Hierdurch wurde die Hypothese, dass es sich bei der Regulation von *dblmsp2* um eine GDV1-abhängige handelt bestätigt. Interessanterweise sind mögliche orthologe Gene von *dblmsp2* nur in den *Laveranian* Spezies und *P. cynomolgy* zu finden, deren Genom in jedem Fall auch ein GDV1 Ortholog besitzt. Somit besteht die Möglichkeit, dass auch in diesen Spezies die Regulation durch GDV1 erfolgt (<https://plasmodb.org/plasmo/app>). Obwohl die Transkription von *dblmsp2* zusammen mit einer Reihe von Gametozyten-spezifischen Genen in Parasiten bei denen sexuelles Commitment induziert wurde hochreguliert ist, weisen die hier gezeigten Ergebnisse nicht auf eine Rolle im Zusammenhang mit der sexuellen Entwicklung hin (103).

Während sich durch die Überexpression von GDV1 in den 3D7-iGP Linien, die Induktion von sexueller Konversion direkt über die Gabe von Shield-1 steuern lässt, so ist dies bei den 3D7 Linien nicht möglich. Hierbei wurde sich zu Nutze gemacht, dass die Konzentration von Lyso-PC ein Umweltfaktor ist, der bekannt ist Einfluss auf die Regulation der sexuellen Konversion zu nehmen (36). Unter Zellkulturbedingungen ahmt man diesen Effekt durch die Gabe von Cholin nach, welches vom Parasiten im Kennedy-Weg zu Lyso-PC verstoffwechselt wird. Allerdings ist nicht aufgeklärt an welchem Punkt der aufeinanderfolgenden Prozesse, die zur sexuellen Konversion führen Lyso-PC bzw. Cholin eine Rolle spielt und welche Umweltfaktoren hier ebenfalls bzw. zusätzlichen Einfluss haben (150). So zeigen Parasiten, bei denen die Konzentration von Cholin im umgebenden Medium verringert wird, eine gering signifikant höhere Konversionsrate in DBLMSP2-KO Parasiten und eine höhere Varianz in den einzelnen Experimenten, als

Parasiten bei denen die Überexpression von GDV1 durch die Gabe von Shield-1 reguliert wird. Da die Transkription von *dblmsp2* abhängig von GDV1 ist, ist dieser Unterschied nicht durch den funktionalen KO begründet, sondern eher durch das Absenken der Cholin Konzentration und eine unspezifische Induktion der sexuellen Konversion. Somit ist durch den funktionalen KO von *dblmsp2* weder bei Parasiten der Linie 3D7 noch der 3D7-iGP ein Einfluss auf die Konversionsraten oder auf die Maturierung der Gametozyten nachweisbar. Dies widerlegt ebenso die Vermutung, dass DBLMSP2 eine notwendige Rolle während der Invasion von sexuell determinierten Merozoiten spielt, da sich eine verringerte Effizienz der Invasion in den Konversionsraten widerspiegeln würde.

Die Transkription von *dblmsp2* ist auch in GDV1-überexprimierenden Parasiten hochreguliert, die kein funktionales AP2-G exprimieren und infolgedessen nicht in die sexuelle Entwicklung übergehen können (103). Daher besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den DBLMSP2⁺ Parasiten um solche handelt, die nicht sexuell determiniert sind. Bestärkend kommt hinzu, dass in Single-Zell-RNAseq-Analysen nachgewiesen werden konnte, dass DBLMSP2 und AP2-G meistens nicht im selben Schizonten exprimiert werden (133). Im Rahmen dieser Studie wurden klinische Isolate und Transkriptome auf die variierende Expression von DBLMSP2 hingehend untersucht. Die Ergebnisse wiesen hier darauf hin, dass es eine Korrelation von *dblmsp2* Transkription mit Gametozyten-assoziierten Genen gibt, allerdings wurde auch hier keine Korrelation zu *ap2-g* Transkriptionsleveln gefunden. Nachdem DBLMSP2 und AP2-G laut dieser Studie nicht im selben Parasiten exprimiert werden, ist eine Korrelation zu Gametozyten-assoziierten Genen eigentlich unerwartet, vor allem da keine Korrelation zu *ap2-g* gefunden wurde. Allerdings werden hierdurch die Ergebnisse von Filarsky *et al.* bestätigt, laut denen erhöhte Transkriptionslevel von *dblmsp2* auch festgestellt werden konnten, wenn ein funktionsloses AP2-G exprimiert wird.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass GDV1 neben der Regulation von Genen, die zum Wechsel des Parasiten in die sexuelle Entwicklung notwendig sind, zusätzlich eine Funktion zur Regulation von Genen des asexuellen Zyklus übernimmt.

Bisher ist der genaue Mechanismus der zu sexuellem Commitment führt noch nicht endgültig aufgeklärt. Es wird aber vermutet, dass unterschiedliche Faktoren zu einer erhöhten Rate von Parasiten führt, die innerhalb eines Entwicklungs-Zyklus von der asexuellen Proliferation in die sexuelle Entwicklung übergehen (150). Hierzu gehören unter anderem die Verfügbarkeit bestimmter Nährstoffe und eine hohe Anzahl von Reticulozyten (287, 310), aber auch Stressfaktoren wie Toxine und Anti-Malaria Medikamente können eine Ursache für einen Anstieg der Commitment Raten sein (40,

91). Zudem lassen sich auch im Verlauf einer Malariainfektion unterschiedlich hohe Konversionsraten feststellen. Zu Beginn einer Infektion sind diese meist niedrig, da eine große Anzahl Gametozyten zwar die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung erhöht, dies aber in einer zu geringen Zahl an sich asexuell replizierenden Parasiten führen könnte. Eine geringere Zahl an Parasiten könnte allerdings das Aufrechterhalten der Infektion erschweren, welches letztendlich den Zeitraum für eine mögliche Übertragung verringern würde (155, 225). Vergleichbar mit sich sexuell fortpflanzenden Organismen, die ebenfalls einen Kompromiss zwischen Fortpflanzung und Überleben eingehen, steht der Parasit in jedem Zyklus vor der Entscheidung wieviel in asexuelle Stadien für die weitere Replikation und wieviel in sexuelle Stadien und den Fortgang des Lebenszyklus investiert werden soll (158, 225, 227, 262).

Epigenetische Regulation ermöglicht es *P. falciparum* sich an wechselnde Bedingungen zu adaptieren und der Immunantwort des Wirtes auszuweichen. Dazu nutzt der Parasit unter anderem alternative Invasionswege und die Variation in den primär exprimierten Antigen-Proteinen (192). Auch wenn DBLMSP2 *in vitro* keinen messbaren Effekt auf die intra-erythrozytäre Entwicklung zeigt, könnte die Expression unter bestimmten Bedingungen einen selektiven Vorteil haben. So konnte eine verringerte Sensitivität gegenüber Halofantrine, Lumefantrine, Mefloquine und deren Derivaten bei DBLMSP2 exprimierenden Parasiten nachgewiesen werden (291, 292). Auf der anderen Seite lässt sich durch die Gabe von Anti-Malaria Medikamenten wie Chloroquine und Mefloquine die Commitment Rate erhöhen (40, 279). Ein weiterer Hinweis eines selektiven Vorteils könnten auch die unterschiedlich hohen Raten der DBLMSP2⁺ Parasiten in unterschiedlichen klinischen *P. falciparum* Isolaten sein (133). Allerdings ist die DBLMSP2 Rate in den untersuchten Isolaten von vier Populationen aus Gebieten in Westafrika mit unterschiedlich hohen Malariainfektionsraten ähnlich, woraus sich schließen lässt, dass die unterschiedlichen Raten nicht ausschließlich auf eine positive Selektion zurückzuführen sind.

Da die Expression von DBLMSP2 aber von GDV1 abhängig ist und eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass es in nicht sexuell determinierten Parasiten exprimiert wird, könnte es sich hierbei um eine Subpopulation von asexuellen Schizonten handeln. Da bisher nicht ausgeschlossen wurde, dass GDV1 einen Effekt auf die Regulation anderer Gene des asexuellen Zyklus hat, könnte die Regulation von Genen durch GDV1 die nicht mit sexuellem Commitment assoziiert sind und eine daraus folgende veränderte phänotypische Vielfalt eine adaptive Strategie zur Erhöhung der Überlebenschancen von asexuellen Parasiten unter bestimmten Bedingungen sein. In diesem Zusammenhang bleibt aufzuklären, ob die Expression von DBLMSP2 an die nachfolgenden Generationen dauerhaft weitergegeben wird.

4.2.2 Die Funktionalität der beiden DBL-Domäne tragenden MSP3-ähnlichen Proteine ist nicht-essentiell für die Invasion von Erythrozyten *in vitro*

Auf Chromosom 10 von *P. falciparum* wird eine Gruppe von ORFs aufgrund des charakteristischen N-terminalen MSP3-Motifs (NLRNA/G) und einer hohen Sequenzähnlichkeit im C-terminalen Bereich zur Multigen-Familie der MSP3-ähnlichen Proteine zusammengefasst (253). Im Unterschied zum C-Terminus haben die Proteine eine hohe Diversität der Sequenzen am N-Terminus. Eine Ausnahme dabei bilden DBLMSP1 und DBLMSP2 die hier eine DBL Domäne aufweisen, was eine den DBL-exprimierenden Invasions-Liganden, wie EBA-175 (285), ähnliche Funktion impliziert. In vorangegangenen Studien konnte für beide Proteine die Fähigkeit einer Trypsin und Neuramidase resistenten Bindung an Erythrozyten (134) und zusätzlich eine wachstumsinhibierende Wirkung spezifischer Antikörper gegen DBLMSP1 und DBLMSP2 nachgewiesen werden (51, 232). Zudem wird vermutet, dass sie Teil des MSP1 Komplexes an der Merozoitenoberfläche sind (172). Das über einen GPI-Anker an der Oberfläche des Merozoiten gebundene MSP1 formt mit einer Reihe von peripheren Merozoiten-Oberflächenproteinen einen Komplex der für die erfolgreiche Invasion notwendig ist (61). Es wird vermutet, dass der Komplex eine Plattform für andere Proteine, wie DBLMSP1 und DBLMSP2, zur Bindung von Erythrozyten darstellt (172). Ein Großteil der bekannten *P. falciparum* Multigen-Familien, wie die *var*, *rifin* und *stevor*, sind meist in subtelomeren Regionen in Multi-Exons organisiert und die Expression eines der Gene der Familie schließt die Transkription der anderen aus. Im Gegensatz dazu liegen Mitglieder der MSP3-ähnlichen Familie als Einzel-Exon vor und werden gleichzeitig in den einzelnen Parasiten exprimiert (253). Ähnlich sieht es im Vergleich mit weiteren Gen-Familien aus, die ebenfalls für Oberflächen-Proteine codieren. So sind die Mitglieder der EBL- und RBL-Proteine ebenfalls in Multi-Exon-Struktur organisiert und es ist neben einer Variabilität in der Genexpression auch eine gewisse Redundanz in ihrer Funktion feststellbar (89, 153, 226). Die strukturelle Besonderheit der DBL-Domäne von DBLMSP1 und DBLMSP2 innerhalb der Familie MSP3-ähnlichen Proteine legt die Vermutung nahe, dass eine redundante und möglicherweise gemeinsame essentielle Funktion vorliegt.

In der Vergangenheit wurden beide Proteine als nicht-essentiell für das Überleben des Parasiten während der asexuellen Entwicklung eingestuft, dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. In Parasiten, die durch einen Knockout entweder kein funktionales DBLMSP1 oder DBLMSP2 exprimieren, zeigte sich kein Effekt auf die asexuelle Replikation (Abbildung 29 und 30). Ebenso ließ sich in beiden Fällen kein Einfluss des Knockouts auf die sexuelle Entwicklung feststellen (Abbildung 30 und 35).

Gegenteilig zu vorherigen Ergebnissen ist ein Knockout beider Gene in einer Parasitenlinie möglich und es zeigt sich kein messbarer Einfluss auf das Überleben *in vitro*, somit ist eine gemeinsame essentielle Funktion der beiden Proteine auszuschließen (172). Allerdings bedeutet dies nicht, dass ein Protein nicht die Funktion des anderen übernehmen bzw. die Abwesenheit kompensieren könnte. Infolgedessen sollte der funktionale Knockout eine vermehrte Expression von DBLMSP2 zur Folge haben. Entgegen dieser Erwartung war in Abwesenheit von DBLMSP1 die Anzahl der DBLMSP2 exprimierenden Parasiten weiterhin auf dem gleichen niedrigen Level von WT-Parasiten (Abbildung 37).

Da *dblmsp2* heterochromatisch vorliegt und die Transkription in 3D7 WT-Parasiten GDV1-abhängig ist, könnte es sein, dass die Expression trotz des DBLMSP1-KOs weiterhin unterdrückt wird. Durch Überexpression von GDV1 sollte dies kompensiert werden, allerdings erhöhte sich die Zahl DBLMSP2⁺ Parasiten ebenfalls nicht signifikant im Vergleich zu Parasiten die DBLMSP1 exprimieren konnten (Abbildung 37). Was bedeutet, dass der Knockout von DBLMSP1 keinen Effekt auf die Expression von DBLMSP2 hat. Somit ist nicht nur eine redundante Funktion der beiden Proteine auszuschließen, sondern ebenso eine Notwendigkeit der beiden Proteine für eine effiziente Invasion *in vitro*. Allerdings lässt sich auf Basis der hier dargestellten Ergebnisse die ausschließlich unter Zellkulturbedingungen generiert wurden keine Aussage darüber treffen, ob die beiden Proteine eine Rolle in Wirt-Parasiten-Interaktionen spielen.

Innerhalb des kurzen Zeitraums zwischen Egress und Invasion sind die Merozoiten direkt der Immunantwort des Wirts ausgesetzt (130). Sowohl DBLMSP1 als DBLMSP2 weisen in der DBL Domäne polymorphe Sequenzen auf, woraus sich schließen lässt, dass beide Proteine sich unter hohem selektiven Druck befinden (210). Da vermittelt durch die DBL-Domäne für beide Proteine eine Funktion möglich ist, die der Funktion anderer DBL-Domäne tragenden Invasionsliganden ähnlich ist. Zusätzlich mit einbezogen wird, dass DBLMSP1 euchromatisch vorliegt und keiner epigenetischen Regulation unterliegt. Besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die zusätzliche Expression von DBLMSP2 zu einer höheren Varianz der Oberflächenantigene führt, die unter bestimmten Bedingungen einen selektiven Vorteil zur Folge haben könnte. Dies könnte unter anderem auch eine Erhöhung der Chance bzw. die Effizienz der Invasion zur Folge haben. Ähnliches ist bei dem Wechsel von Sialin-abhängigem zu Sialin-unabhängigem Invasionsweg zu beobachten, welcher durch eine erhöhte Expression bestimmter Rh- und EBL-Proteine möglich wird (208). Ein weiteres Beispiel sind die Gene der *var* Gen-Familie, bei denen im Unterschied zu DBLMSP2 viele Gene für ein Protein in unterschiedlichen Varianten codiert wird, was eine Varianz der Antigene zur Folge hat (241).

Da ursprünglich angenommen wurde, dass DBLMSP2 eine Rolle bei der Invasion von sexuell determinierten Merozoiten spielt, wurde in diesem Zusammenhang vermutet, dass die Anwesenheit von DBLMSP2 an der Oberfläche von Merozoiten eine Präferenz zur Bindung an eine bestimmte Gruppe von Blutzellen vermitteln könnte. Bisher ist noch nicht endgültig aufgeklärt, wie sexuell determinierte Parasiten in das Knochenmark gelangen (148). Bei Autopsien wurden im Knochenmark von Malaria-Patienten neben Gametozyten auch asexuelle Parasiten gefunden (72). Daher besteht die Möglichkeit, dass die Parasiten nicht ausschließlich erst während der Entwicklung ins Knochenmark gelangen, sondern die sexuelle Determinierung auch im Knochenmark induziert werden kann. Für diese Theorie spricht, dass die Konzentration von Lyso-PC, was nur in einer niedrigeren Konzentration im Knochenmark vorhanden ist, einen Einfluss auf die sexuelle Konversion hat (36). Geht man jetzt davon aus, dass Gametozyten nicht aktiv ins Knochenmark einwandern, sondern die sexuelle Determinierung erst im Knochenmark geschieht, so wäre es für die sexuell determinierten Merozoiten von Vorteil möglichst junge bzw. Vorläuferzellen von Erythrozyten (Reticulozyten) zu invadieren. Bei *P. vivax* ist z. B. eine Präferenz zur Invasion von Reticulozyten nachgewiesen (189). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Theorie weder bestätigt noch widerlegt werden. Aufgrund der niedrigen Raten von DBLMSP2-exprimierenden Parasiten, wäre es nur schwer möglich gewesen unter Zellkulturbedingungen aussagekräftige Daten zu bekommen.

Da ausschließlich nur asexuelle und sexuelle Blutstadien untersucht wurden, lässt sich eine Funktion der beiden Proteine in den Leber- und Moskitostadien nicht ausschließen. So wurden von beiden Proteinen mit Illumina-basierter Sequenzierung neben Schizonten und späten Trophozoiten eine erhöhte Zahl von mRNA Transkripten in Ookineten gefunden (176). Da der Schwerpunkt dieser Publikation nicht auf DBLMSP1 und DBLMSP2 lag, liegen außer den Transkript-Analysen keine weiteren Daten vor. Möglich wäre in diesem Zusammenhang aber das über DBLMSP2 und einen geeigneten Rezeptor eine erste Bindung von Ookinete an die Epithelzellen des Verdauungstraktes der Moskito vermittelt. Bisher ist allerdings wenig über die Interaktionen von Ookinete und Epithelzellen und die beteiligten Rezeptoren bekannt (296)

4.3 Eine putative funktionelle Domäne von GDV1 hat eine PIN-Domänen-ähnliche Struktur

Die Genexpression von *P. falciparum* ist ein streng kontrollierter Prozess, welcher während der gesamten Entwicklung zu hochsynchronen periodischen Expressionsmustern führt (34, 260). Hierbei sind vor allem Transkriptionsfaktoren wichtige Regulatoren, aber auch epigenetische Regulatoren und Genom-weite Veränderungen in der Chromatinstruktur (135, 229, 284). Unter anderem sind im Genom

von *P. falciparum* die Apicomplexan Apetala2 (ApiAP2) Proteine codiert, bei denen es sich um eine Familie von Sequenz-spezifischen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren handelt, deren Mitglieder in nahezu jedem Stadium der Entwicklung eine Rolle bei der Regulation spielen (152, 256). Hierzu gehört auch AP2-G, dessen Transkription während der asexuellen Entwicklung durch HP1 und Hda2 unterdrückt wird (35, 53, 177). Die HP1-vermittelte Unterdrückung ist konserviert bei den unterschiedlichen *Plasmodium* Spezies und ist durch die Bindung von HP1 an H3K9me3 Histone und die dadurch vermittelte Kondensierung des Euchromatins zu heterochromatischen Bereichen in subtelomeren Regionen, als auch einiger zentraler Bereiche gekennzeichnet (106, 108, 177, 219, 233). Im Genom von *P. falciparum* sind innerhalb der heterochromatischen Bereiche, die mit HP1 assoziiert sind, etwa 400 Proteine codiert, wovon die meisten zu exportierten Virulenzfaktoren und variablen Oberflächenantigenen gehören (106, 108). Im Gegensatz zu den meisten HP1-assoziierten Genbereichen, ist *ap2-g* Transkription in *P. falciparum* abhängig von GDV1 und wird somit unabhängig von den anderen HP1 assoziierten Genen reguliert (103). Da GDV1 nach heutigem Kenntnisstand nicht an der Regulation aller HP1 assoziierten Gene beteiligt ist, stellt sich die Frage welche Faktoren beteiligt sind und als Erkennungssignal für GDV1 dienen. Hierbei könnte es sich um andere Proteine oder auch RNA handeln, möglich wäre auch ein bestimmtes DNA-Motif in der Nähe der Promotoren, welches von GDV1 erkannt, gebunden und zur Destabilisierung der Bindung von HP1 am Chromatin führt. Um aufzuklären, welcher Mechanismus hier zugrunde liegt, wurde in dieser Arbeit die Struktur von GDV1 hingehend auf mögliche Hinweise zur Funktionsweise und der beteiligten Bereiche untersucht.

4.3.1 Die Struktur von GDV1 liefert Hinweise auf seine regulatorische Funktionsweise und eine putative funktionelle Domäne

Annotationen von Genen werden häufig basierend auf Ähnlichkeiten zu Sequenzen von bekannten und gut untersuchten Proteinen gemacht (30). Dieses Vorgehen hat zur Folge, dass ausgehend von einem Protein mit bekannter Funktionsweise Gene identifiziert werden, die für Proteine mit ähnlicher Funktion und somit der gleichen Gruppe von Enzymen codieren könnten. Im Fall von GDV1 ist die Funktion bekannt, allerdings wurde bisher noch nicht aufgeklärt welche enzymatische Aktivität dem zugrunde liegt. Zusätzlich handelt es sich bei GDV1 um ein Protein, welches nur in *Plasmodium* vorkommt und für das bisher keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen gefunden wurden. Durch die stetige Weiterentwicklung und den Einsatz verschiedener komplexer Algorithmen ist es inzwischen möglich Modelle von dreidimensionalen

Strukturen unbekannter Proteine relativ sicher vorherzusagen. Durch die weitere Kombination verschiedener bioinformatischer Tools zur Analyse von Proteinsequenzen und -strukturen ist es möglich in Proteindatenbanken Ähnlichkeiten zu gespeicherten Strukturen zu finden und mögliche Hinweise auf die Funktion des Proteins zu finden. Ein weiterer Vorteil bioinformatischer Tools ist, die Möglichkeit unerwartete Komponenten und Beteiligung an unerwarteten Stoffwechselwegen aufzudecken.

Für GDV1 sollten in erster Linie Hinweise auf die Art der Interaktion von GDV1 mit HP1 und eine putative funktionale Domäne gefunden werden. Auf Basis der von I-TASSER und ColabFold berechneten Strukturmodelle wurden Proteine mit ähnlicher Struktur aus der PDB-Datenbank identifiziert. Die Proteine mit dem höchsten TM-Score und Z-Score fielen hier in die Kategorie der Hydrolasen, Nukleasen und DNA/RNA-bindenden Proteine. Da GDV1 eine entscheidende regulatorische Funktion während der Gametozytogenese hat, die auf eine bisher noch nicht aufgeklärte Art der Interaktion mit HP1 am *ap2-g* Locus beruht (103), ist eine Ähnlichkeit zu Proteinen nicht überraschend, deren Substrat DNA bzw. RNA ist. Nukleasen sind eine Gruppe von Enzymen, die hauptsächlich Nukleinsäuren abbauen. Hier sind ein Beispiel die Restriktionsendonukleasen, die in der Praxis als rekombinante Proteine zum Verdau von Plasmiden usw. eingesetzt werden.

Auch wenn es eher unwahrscheinlich ist, dass die strukturelle Ähnlichkeit mit dieser Gruppe von Enzymen bedeutet, dass GDV1 ebenfalls eine enzymatische Aktivität zum Abbau von Nukleinsäuren hat, so könnte trotz fehlender Aktivität eine Affinität zu Nukleinsäuren vermittelt werden. Somit könnte dies darauf hinweisen, dass GDV1 in der Lage ist Chromatinstrukturen „zu erkennen“ und in der Folge direkt mit HP1, einem weiteren bisher unbekannten Molekül oder der DNA zu interagieren. Die Top 5 über TM-align von I-Tasser als strukturell ähnlich identifizierten Proteine sind Cpf1 (Cas12a) Proteine. Diese Proteine gehören zu den Typ V (Klasse II) CRISPR Effektoren, die sowohl RNase als DNase Aktivität haben (231). Im Gegensatz zu anderen Klasse II Cas Proteinen handelt es sich um Endonucleasen, die über eine einzelne crRNA die Ziel-DNA schneiden können (318). Die strukturelle Ähnlichkeit von GDV1 zu dieser Klasse von Proteinen suggeriert, dass GDV1 potentiell ebenfalls eine ähnliche Funktionsweise haben könnte. Somit besteht die Möglichkeit, dass GDV1 ebenfalls RNA bzw. DNA erkennen und mit diesen interagieren kann.

Orthologe Proteine zu GDV1 sind in allen Primaten infizierenden *Plasmodium* Spezies zu finden. Durch Sequenzalignements konnte gezeigt werden, dass sich trotz der geringen Sequenzidentität von 35,35% innerhalb der Sequenzen kurze hochkonservierte Bereiche finden lassen. Hierbei wurde für einen dieser Bereiche über Homologien mit Proteinen anderer Organismen eine Struktur identifiziert, die einer PIN-Domäne ähnelt (Abbildung 40). Proteine die eine PIN-ähnliche Domäne enthalten, bilden eine weit verbreitete

Superfamilie von Nukleasen, die sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität, des Reaktionsmechanismus, der biologischen Funktion und der taxonomischen Verteilung stark unterscheiden (185). Sie sind häufig an wichtigen zellulären Prozessen wie DNA-Replikation und -Reparatur, Degradation der mRNA und Regulation der Transkription beteiligt. Typisch für diese Domäne ist eine Rossmann-Faltung, die aus einem zentralen β -Faltblatt mit fünf parallelen β -Strängen auf beiden Seiten umgeben von α -Helices ($\alpha/\beta/\alpha$ -Sandwich-Faltung) besteht und meist in der C-terminalen Region der β -Stränge hochkonservierte saure Aminosäurenreste das aktive Zentrum bilden, indem sie 2- oder 3-wertige Metallionen koordinieren. In eukaryotischen Zellen sind sie vor allem Teil von RNA-assoziierten Prozessen. Das Chromodomain Protein Chp1 gehört zum *RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS)* Komplex, welcher in *S. pombe* eine zentrale Funktion bei der Bildung von Heterochromatin übernimmt, indem er die Sequenzspezifität des RNAi-Effektorprotein Argonaut mit der Fähigkeit zur Erkennung von H3K9 Methylierungsstellen durch die Chromodomäne von Chp1 koordiniert (236). Die Verbindung von Chp1 und Tas3 bildet hier eine Brücke zwischen Chromatin und RNAi-Maschinerie. Trotz fehlender Nukleaseaktivität ist die PIN-Domäne hier erforderlich für post-transkriptionale Unterdrückung der Expression an den subtelomeren Enden. Ähnlich wie HP1 ist Chp1 in unterschiedlichen Regionen des Chromosoms an der Regulation beteiligt, allerdings ist die PIN-Domäne hierbei nicht notwendig (237).

Da die Sequenzen der PIN-ähnlichen Domänen eine hohe Diversität aufweisen, werden sie in unterschiedliche Gruppen basierend auf Struktur, Sequenz und Funktion eingeteilt. Der konservierte Bereich von GDV1 gehört innerhalb dieser Klassifizierung zu den NYN-ähnlichen Nukleasen, welche über vier konservierte saure Reste eine Metallion binden können und in Bakterien in Zusammenhang mit tRNA und rRNA Prozessierung stehen (11). Die größten strukturellen Ähnlichkeiten zu GDV1 wurden in der Gruppe der NYN.COG1432, den labA-ähnlichen Proteinen gefunden. Interessanterweise sind im Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* LabA und sein paralog LalA notwendig für die Regulierung der negativen Feedback Expression von KaiC, welches zentraler Bestandteil des circadianen Rhythmus ist (271, 272). In Eukaryoten sind LabA-ähnliche Domänen zumeist bei Pilzen zu finden, wo sie meist mit Oskar-TDRD5/TDRD7 HTH (OST-HTH) RNA-Binde-Domänen fusioniert sind. In *Rhizophagus* wurde die LabA-ähnliche PIN-Domäne in einer Reihe von Effektoren der Pflanzen Pathogenese gefunden und es besteht die Vermutung, dass sie als Toxin verschiedene spezifische Wirts-RNAs als Ziel haben (319).

Die Beteiligung der unterschiedlichen PIN-ähnlichen Domänen an genregulatorischen Prozessen unterstreicht die These, dass es sich bei dieser Domäne um den funktionalen Bereich in der Interaktion mit HP1 und dem Chromatin handelt. Ebenfalls dafür spricht, dass die PIN-ähnlichen Domänen ähnlich wie GDV1 mit Proteinen interagieren, die mit dem Chromatin assoziiert sind oder es eine über RNA-Bindung vermittelte Regulation ist. Zudem könnte die PIN-Domänen vermittelte Bindung eine Erklärung für die spezifische Bindung, von GDV1 an HP1 in bestimmten Bereichen des Heterochromatins sein, da diese in Chp1 in *S. Pombe* scheinbar eine ähnlich spezifische Regulation vermittelt (236). Da PIN-ähnliche Domänen in den meisten Fällen in Zusammenhang mit RNA stehen, liegt die Vermutung nahe, dass GDV1 und seine Orthologe in *Plasmodium* ebenfalls die Fähigkeit zur Bindung von RNA haben. Versuche im Rahmen dieser Arbeit GDV1 aus 3D7 Parasiten zu isolieren, ohne die Proben mit RNase, DNase und H3K9me Proteinen zu behandeln, sind fehlgeschlagen, daher fehlt hierfür bisher der experimentelle Nachweis. In Mäusen ist die zielgerichtete Fähigkeit von HP1a an das Heterochromatin zu binden, abhängig von der Bindung von RNA in einem konservierten Bereich der Hinge Region und methylierten Histonen über die Chromo-Domäne (202). Zudem scheint die RNA notwendig für die stabile Bindung von HP1 an das Heterochromatin zu sein (181). Daher besteht die Möglichkeit, dass GDV1 entgegen vorheriger Vermutungen mit der Chromoshadow Domäne interagiert (41), an die Hinge Region-gebundene RNA bindet und dies eine Destabilisierung der Bindung von HP1 an das Chromatin zur Folge hat.

Nachdem mit Hilfe der Sequenz- und Strukturanalysen ein Bereich in der Sequenz von GDV1 identifiziert werden konnte, der möglicherweise die Interaktion mit GDV1 vermittelt, wurde im nächsten Schritt die Funktion der putativen PIN-Domäne näher untersucht. Hierfür wurden zusätzlich die putativen funktionellen ASP-Reste innerhalb der Domäne, die sich über den Bereich von Valin (V264) bis Histidin (H420) erstreckt, an den Positionen D389, D400, D408 und D410 identifiziert (Abbildung 42). Durch Einfügen von Mutationen in dem Bereich wurde der Effekt auf die Funktion von GDV1 im Zusammenhang mit der Induktion der sexuellen Entwicklung untersucht.

4.3.2 Die putative PIN-Domäne ist notwendig für die nukleäre Lokalisation und Funktion von GDV1

Unter Kulturbedingungen sind sowohl die asexuelle als auch die sexuelle Entwicklung fester Bestandteil des Lebenszyklus, hierbei gehen aus jedem Zyklus Merozoiten hervor, die entweder zu Gametozyten differenzieren oder weiterhin asexuell proliferieren (92). Hierbei zeigen verschiedene *P. falciparum* Linien unterschiedlich hohe sexuelle Differenzierungsraten, was unter anderem auf variierenden genetischen Hintergrund der einzelnen Linien zurückführbar ist (263). So wurde z. B. häufig bei *in vitro* kultivierten

Parasiten, die keine Gametozyten mehr produzieren, eine spontane Mutation innerhalb des *gdv1* Locus festgestellt, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führten (92, 173). Von Tibúrcio *et al.* wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch den Verlust von 39 Aminosäuren am c-terminalen Ende ein Teil der nukleären Lokalisationssequenz fehlen könnte und somit GDV1 nicht mehr im Nukleus lokalisiert und die Interaktion mit HP1 nicht möglich sei (281). Sie konnten aber nachweisen, dass GDV1 weiterhin in den Nukleus lokalisiert und die Fähigkeit mit HP1 zu interagieren weiterhin gegeben ist, vermuteten aber, dass der Verlust der Aminosäure am C-terminus zu einer geringeren Stabilität des Proteins führt und dies der Grund für die geringen Konversionsraten ($\leq 0,1\%$) von Parasiten mit dieser Mutation ist.

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mutationen in Form von Punktmutation der putativen funktionellen Reste innerhalb der putativen PIN-Domäne bzw. der Deletion der gesamten Domäne von GDV1 zu einer Mislokalisierung des Proteins ins Cytosol führt (Abbildung 45 und 46). Dies kann darin begründet sein, dass der Austausch der Aminosäure bzw. die Entfernung der Domäne zu einer Fehlfaltung des Proteins führt und es nicht zum Transport des Proteins in den Nukleus kommt. Dagegen spricht allerdings, dass in den meisten Fällen zumindest ein diffuses GFP-Signal der GDV1 Varianten zusammen mit einer teilweisen dem Wildtyp entsprechenden Lokalisation nachweisbar ist (Abbildung 46).

Dies spricht eher dafür, dass in Folge der veränderten Aminosäure die Affinität bzw. die Interaktion des Proteins mit dem Chromatin bzw. HP1 geringer ausgeprägt sind und dadurch keine dauerhafte Lokalisation im Nukleus möglich ist. Diese Hypothese lässt sich bestätigen, durch die Betrachtung der Verteilung der Lokalisation von GDV1 in den Parasiten, die GDV1 Varianten mit zwei ausgetauschten Aminosäuren innerhalb der Domäne. Hier lässt sich noch eine deutliche gemeinsame Lokalisation von Chromatin und GDV1 und außerdem ein Zusammenhang zwischen Lokalisation und Konversionsraten erkennen. Hierbei ist allerdings auffällig, dass sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Linien erkennbar ist, der aber die gefundene Rate der sexuellen Konversion widerspiegelt.

Zudem zeigt sich, dass induzieren von sexuellem Commitment nicht allein von der Anwesenheit von GDV1 am Chromatin abhängt, sondern ebenso die Menge des im Nucleus lokalisierten Proteins eine Rolle spielt. So ließ sich durch Überexpression von GDV1-ALA bzw. GDV1 Δ 384-421 in 3D7/GDV1-KO Parasiten mit nahezu vollständiger cytosolischer Lokalisation des GDV1 kein Commitment induzieren. Während die Überexpression von episomalem GDV1, GDV1-ASP/ASN und GDV1-ASP/ALA die Produktion von Gametozyten zur Folge hatte. Hierbei lag bei Parasiten mit fast ausschließlich nukleärer Lokalisation die Konversionsrate im Bereich der 3D7-iGP

(Abbildung 30 C). Für die anderen Linien ließ sich eine ähnliche Tendenz vom Anteil der Kern-Lokalisierungen zur Konversionsrate erkennen. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen auch Filarsky *et al.* indem sie feststellten, dass Induzieren von sexuellem Commitment abhängig ist von der Menge des vorhandenen GDV1 bzw. dass ein gewisser Schwellenwert überschritten werden muss, um überhaupt erfolgreich Commitment zu induzieren (103). Ausgehend von der Hypothese, dass es sich bei dem untersuchten konservierten Bereich zwischen Prolin (P385) und Histidin (H420) um eine funktionale Domäne von GDV1 handelt, die Funktion darin besteht, RNA zu binden und hierdurch die Bindung von HP1 an das Heterochromatin zu destabilisieren. So sprechen die Ergebnisse dafür, dass die vier ASP-Reste notwendig für die Interaktion von GDV1 mit HP1 am *ap2-g* Locus sind. Zudem zeigt auch der Austausch von zwei ASN einen nicht unerheblichen Effekt auf die Funktion von GDV1, was vermutlich auf eine verringerte Affinität bzw. instabilere Bindung zurückzuführen ist und somit eine effiziente nachhaltige Destabilisierung der Bindung von HP1 nur in wenigen Fällen erreicht werden kann.

Weiterführend sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob die isolierte Domäne die Fähigkeit hat an HP1, Chromatin bzw. RNA zu binden, z. B. durch Protein-Protein-Interaktions-Assays. Hier könnten unter anderem EMSAs (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*) durchgeführt werden, da hier mit relativ einfachen Methoden eine Bindung an DNA/RNA nachgewiesen werden könnte. Zudem könnte untersucht werden, ob die Domäne mit rekombinant exprimiertem HP1 interagiert. Um weitere mögliche mit GDV1 interagierende Proteine zu identifizieren wäre auch eine BioID eine Möglichkeit. In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant zu überprüfen, ob der Austausch der vier Aminosäuren ebenfalls einen messbaren Effekt zeigt. Außerdem stellt sich die Frage, ob sich der beobachtete Einfluss auf das Commitment und somit die Repression von *ap2-g* auch Gene wie *dblmsp2* betrifft, die nicht im Zusammenhang mit der sexuellen Entwicklung stehen.

4.4 Zusammenfassung

Trotz intensiver Forschung und erheblicher Fortschritte bei der Entwicklung und Zulassung von Vakzinen und Medikamenten, besteht für Menschen in Malaria-endemischen Gebieten weiterhin das Risiko einer Infektion und etwa 247 Millionen Todesfälle wurden in 2021 registriert (214). Dies ist vor allem in dem komplexen Lebenszyklus des Parasiten begründet, der sich durch einen Wechsel zwischen verschiedenen Wirten, der Adaption an unterschiedlichste Lebensbedingungen und verknüpft mit der Fähigkeit sowohl zur asexuellen Proliferation als auch der sexuellen Differenzierung innerhalb der humanen Erythrozyten auszeichnet. Bemerkenswert ist

außerdem das Potenzial die Immunantwort des Wirts durch Stadien-spezifische und variable Expression von Antigenen zu umgehen und die Fähigkeit unterschiedliche Invasionswege zu Nutzen.

In diesem Zusammenhang spielen die regulatorischen Mechanismen und insbesondere die Epigenetik und die zugehörigen Proteine eine zentrale Rolle und es besteht die Notwendigkeit weiterer intensiver Forschung. Aber auch grundlegende Prozesse, wie die Invasion sind noch nicht endgültig verstanden und da hier einer der Angriffspunkte zur Vakzin-Entwicklung ist, sollte auch hier weiterhin ein Schwerpunkt der Forschung liegen.

In dieser Arbeit liefere ich eine funktionale Analyse potentieller Lektin-Bindestellen des essentiellen Proteins CyRPA und deren Rolle während der Invasion. In einem weiteren Teil wurden die beiden Oberflächenproteine DBLMSP1 und DBLMSP2 hinsichtlich ihrer Funktion während der sexuellen und asexuellen Entwicklung untersucht. Weiterführend wurde basierend auf Strukturanalysen, die molekulare Funktionsweise von GDV1 in Verbindung mit der Induzierung von sexuellem Commitment versucht aufzuklären.

Durch die gezielte Mutation der funktionellen Aminosäure innerhalb der Lektin-Bindestellen konnte ich zeigen, dass die Lektin-Aktivität von CyRPA notwendig für eine effiziente Invasion von Erythrozyten ist und seine essentielle Funktion somit nicht darauf beschränkt ist als Verbindung zwischen Ripr und Rh5 zu fungieren. Das Blockieren der Invasion während der erythrozytären Phase ist ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung von neuen Vakzinen (200). Ausgehend davon, dass erfolgversprechende Vakzin Kandidaten gegen den Rh5-CyRPA-Komplex in prä-klinischen Studien positive Resultate erzielen konnten, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Lektin-Aktivität von CyRPA als weiteren potentiellen Angriffspunkt zur Entwicklung neuer inhibitorischer Wirkstoffe (47, 80). Des Weiteren bietet der Nachweis der Lektin-Aktivität von CyRPA in *P. falciparum* eine Möglichkeit zur weiteren Aufklärung der essentiellen Funktion von CyRPA in *P. knowlesi* und *P. vivax*. Beide Spezies können Invasionswege nutzen, die nicht von der Anwesenheit des Rezeptors Basigin abhängen, während CyRPA für *P. knowlesi* essentiell für die Invasion ist, allerdings nicht im Komplex mit Ripr, CSS und PTRAMP vorliegt (157). Da bisher kein Rezeptor für *PkCyRPA* identifiziert werden konnte, *P. reichenowi* CyRPA ebenfalls eine Affinität zur Bindung von Glykanen aufweist (69), besteht die Möglichkeit, dass *PkCyRPA* eine ähnliche Affinität und Lektin-Aktivität zeigt und dies hilft weitere Interaktionspartner und die molekulare Funktion aufzuklären.

In einem weiteren Teil konnte ich zeigen, dass die beiden MSP3-ähnlichen Proteine DBLMSP1 und DBLMSP2 keine redundante essentielle Funktion, während der intra-erythrozytären Phase *in vitro* haben, sondern dass die Expression von eher *dblmsp2* für

eine höherer Varianz an Antigenen zuträglich ist. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Regulation der Transkription von *dblmsp2* eine GDV1-abhängige ist. Zusätzlich wurde hiermit gezeigt, dass GDV1 neben *ap2-g* Gene reguliert, die nicht in Zusammenhang mit sexuellem Commitment stehen, was einen völlig neuen Aspekt zur regulatorischen Funktion von GDV1 bedeutet. Über die Identifikation weiterer GDV1-abhängiger Gene, die ebenfalls keine Rolle in der sexuellen Entwicklung spielen, ließe sich möglicherweise aufklären, ob und welcher Prozess hierdurch gesteuert wird. Dies könnte bezogen auf DBLMSP2 ebenfalls weitere Hinweise auf die Funktion geben. Zudem könnte es helfen zu verstehen, welcher Faktor ursächlich für das Umschalten zum sexuellen Commitment ist. Zudem wäre es interessant aufzuklären, ob die Aktivierung der Transkription von *ap2-g* durch GDV1 die ursprüngliche Funktion ist oder erst im Laufe der Evolution hinzugekommen ist. Schließlich sind Orthologe von GDV1 in allen Primaten- und Vögel-infizierenden *Plasmodium* Spezies zu finden, allerdings nicht in Nagetier-infizierenden (<https://plasmodb.org/plasmo/app>). Für *P. berghei* konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass sexuelles Commitment nicht durch die Konzentration von LysoPC beeinflussbar ist (36). Bisher wurde noch nicht geklärt, ob die Parasiten dieser *Plasmodium* Spezies einen alternativen mit HP1 interagierenden Faktor exprimieren oder ob ein völlig anderer Mechanismus zugrunde liegt.

Neben der Identifizierung einer funktionalen Domäne von GDV1 die wahrscheinlich direkt oder indirekt mit HP1 interagiert, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit weiterhin die Frage offen, welcher Faktor dazu führt, dass GDV1 nicht an der Regulation aller HP1-assoziierten Gene beteiligt ist. Ein Hinweis darauf, dass es einen Faktor, wie z.B. eine spezifische RNA/DNA, gibt, liefert die Regulation von DBLMSP2. In den meisten Fällen werden *ap2-g* und *dblmsp2* wahrscheinlich nicht im selben Parasiten exprimiert, was den Schluss zulässt, das entweder Commitment-relevante Gene oder eine andere Gruppe von Genen reguliert wird (111). Diese Entweder/Oder-Regulation lässt sich am plausibelsten durch einen weiteren Faktor erklären, der die Affinität von GDV1 zu HP1 der jeweiligen Genorte beeinflusst.

Abschließend bietet diese Arbeit weitere Ansätze zur Aufklärung der molekularen Funktion des Proteins CyRPA und daraus resultierende Ansätze zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria. Außerdem bieten die Ergebnisse im Zusammenhang mit GDV1 interessante Ansätze zur weiteren Aufklärung seiner Struktur und molekularen Funktion.

Literaturverzeichnis

1. Abel, S., Le Roch, K. G., The role of epigenetics and chromatin structure in transcriptional regulation in malaria parasites. *Briefings in Functional Genomics* **18**, 302-313 (2019).
2. Adams, J. H., Blair, P. L., Kaneko, O., Peterson, D. S., An expanding ebl family of plasmodium falciparum. *Trends in parasitology* **17**, 297-299 (2001).
3. Aguilar, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A. H., Moraleda, C., Joice, R., Cisteró, P., Li Wai Suen, C. S., Nhabomba, A., Macete, E., Mueller, I., Molecular evidence for the localization of plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. *Blood, the journal of the american society of hematology* **123**, 959-966 (2014).
4. Ahmed, M., Cox-Singh, J., Plasmodium knowlesi—an emerging pathogen. *ISBT science series* **10**, 134-140 (2015).
5. Aikawa, M., Huff, C. G., Sprinz, H., Fine structure of the asexual stages of plasmodium elongatum. *The Journal of cell biology* **34**, 229-249 (1967).
6. Alano, P., Plasmodium falciparum gametocytes: Still many secrets of a hidden life. *Molecular microbiology* **66**, 291-302 (2007).
7. Alonso, P. L., Sacarlal, J., Aponte, J. J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., Mandomando, I., Spiessens, B., Guinovart, C., Espasa, M., Efficacy of the rts, s/as02a vaccine against plasmodium falciparum infection and disease in young african children: Randomised controlled trial. *The Lancet* **364**, 1411-1420 (2004).
8. Amambua-Ngwa, A., Tetteh, K. K., Manske, M., Gomez-Escobar, N., Stewart, L. B., Deerhake, M. E., Cheeseman, I. H., Newbold, C. I., Holder, A. A., Knuepfer, E., Population genomic scan for candidate signatures of balancing selection to guide antigen characterization in malaria parasites. *PLoS genetics* **8**, e1002992 (2012).
9. Anamika, Srinivasan, N., Krupa, A., A genomic perspective of protein kinases in plasmodium falciparum. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **58**, 180-189 (2005).
10. Anantharaman, V., Aravind, L., The nyn domains: Novel predicted rnases with a pin domain-like fold. *RNA Biol* **3**, 18-27 (2006).
11. Anantharaman, V., Aravind, L., The nyn domains: Novel predicted rnases with a pin domain-like fold. *RNA Biology* **3**, 18-27 (2006).
12. Arama, C., Troye-Blomberg, M., The path of malaria vaccine development: Challenges and perspectives. *Journal of internal medicine* **275**, 456-466 (2014).
13. Aravind, L., Anantharaman, V., Koonin, E. V., Monophyly of class i aminoacyl trna synthetase, uspa, etfp, photolyase, and pp-atpase nucleotide-binding domains: Implications for protein evolution in the rna world. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **48**, 1-14 (2002).
14. Armstrong, C. M., Goldberg, D. E., An fkbp destabilization domain modulates protein levels in plasmodium falciparum. *Nature Methods* **4**, 1007-1009 (2007).
15. Ay, F., Bunnik, E. M., Varoquaux, N., Bol, S. M., Prudhomme, J., Vert, J.-P., Noble, W. S., Le Roch, K. G., Three-dimensional modeling of the p. Falciparum genome during the erythrocytic cycle reveals a strong connection between genome architecture and gene expression. *Genome research* **24**, 974-988 (2014).
16. Bai, Y., Huang, W., Ma, L.-T., Jiang, J.-L., Chen, Z.-N., Importance of n-glycosylation on cd147 for its biological functions. *International journal of molecular sciences* **15**, 6356-6377 (2014).
17. Baker, D. A., Stewart, L. B., Large, J. M., Bowyer, P. W., Ansell, K. H., Jiménez-Díaz, M. B., El Bakkouri, M., Birchall, K., Dechering, K. J., Boulloc, N. S., Coombs, P. J., Whalley, D., Harding, D. J., Smiljanic-Hurley, E., Wheldon, M. C., Walker, E. M., Dessens, J. T.,

- Lafuente, M. J., Sanz, L. M., Gamo, F. J., Ferrer, S. B., Hui, R., Bousema, T., Angulo-Barturén, I., Merritt, A. T., Croft, S. L., Gutteridge, W. E., Kettleborough, C. A., Osborne, S. A., A potent series targeting the malarial cgmp-dependent protein kinase clears infection and blocks transmission. *Nat Commun* **8**, 430 (2017).
18. Balaji, S., Babu, M. M., Iyer, L. M., Aravind, L., Discovery of the principal specific transcription factors of apicomplexa and their implication for the evolution of the ap2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Res* **33**, 3994-4006 (2005).
 19. Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B. F. C., Cortés, A., Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite plasmodium falciparum. *Nat Microbiol* **4**, 144-154 (2019).
 20. Bannister, L., Hopkins, J., Fowler, R., Krishna, S., Mitchell, G., A brief illustrated guide to the ultrastructure of plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitology today* **16**, 427-433 (2000).
 21. Bannister, L., Mitchell, G., The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends in parasitology* **19**, 209-213 (2003).
 22. Bano, N., Romano, J. D., Jayabalasingham, B., Coppens, I., Cellular interactions of plasmodium liver stage with its host mammalian cell. *Int J Parasitol* **37**, 1329-1341 (2007).
 23. Barrio-Hernandez, I., Yeo, J., Jänes, J., Mirdita, M., Gilchrist, C. L. M., Wein, T., Varadi, M., Velankar, S., Beltrao, P., Steinegger, M., Clustering predicted structures at the scale of the known protein universe. *Nature* **622**, 637-645 (2023).
 24. Batchelor, J. D., Zahm, J. A., Tolia, N. H., Dimerization of plasmodium vivax dbp is induced upon receptor binding and drives recognition of darc. *Nature structural & molecular biology* **18**, 908-914 (2011).
 25. Baum, J., Chen, L., Healer, J., Lopaticki, S., Boyle, M., Triglia, T., Ehlgen, F., Ralph, S. A., Beeson, J. G., Cowman, A. F., Reticulocyte-binding protein homologue 5—an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by plasmodium falciparum. *Int J Parasitol* **39**, 371-380 (2009).
 26. Baum, J., Maier, A. G., Good, R. T., Simpson, K. M., Cowman, A. F., Invasion by p. Falciparum merozoites suggests a hierarchy of molecular interactions. *PLoS pathogens* **1**, e37 (2005).
 27. Baum, J., Papenfuss, A. T., Mair, G. R., Janse, C. J., Vlachou, D., Waters, A. P., Cowman, A. F., Crabb, B. S., de Koning-Ward, T. F., Molecular genetics and comparative genomics reveal rai is not functional in malaria parasites. *Nucleic Acids Res* **37**, 3788-3798 (2009).
 28. Bei, A. K., Brugnara, C., Duraisingh, M. T., In vitro genetic analysis of an erythrocyte determinant of malaria infection. *The Journal of infectious diseases* **202**, 1722-1727 (2010).
 29. Bennink, S., Kiesow, M. J., Pradel, G., The development of malaria parasites in the mosquito midgut. *Cellular Microbiology* **18**, 905-918 (2016).
 30. Böhme, U., Otto, T. D., Sanders, M., Newbold, C. I., Berriman, M., Progression of the canonical reference malaria parasite genome from 2002-2019. *Wellcome Open Res* **4**, 58 (2019).
 31. Bolte, S., Cordelières, F. P., A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy* **224**, 213-232 (2006).
 32. Boltryk, S. D., Passecker, A., Alder, A., Carrington, E., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G. J., van der Starre, A., Beck, H. P., Sauerwein, R. W., Kooij, T. W. A., Brancucci, N. M. B., Proelochs, N. I., Gilberger, T. W., Voss, T. S., Crispr/cas9-engineered inducible gametocyte producer lines as a valuable tool for plasmodium falciparum malaria transmission research. *Nat Commun* **12**, 4806 (2021).

33. Boyle, M. J., Wilson, D. W., Beeson, J. G., New approaches to studying plasmodium falciparum merozoite invasion and insights into invasion biology. *Int J Parasitol* **43**, 1-10 (2013).
34. Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J., DeRisi, J. L., The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of plasmodium falciparum. *PLoS biology* **1**, e5 (2003).
35. Brancucci, N. M., Bertschi, N. L., Zhu, L., Niederwieser, I., Chin, W. H., Wampfler, R., Freymond, C., Rottmann, M., Felger, I., Bozdech, Z., Heterochromatin protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites. *Cell host & microbe* **16**, 165-176 (2014).
36. Brancucci, N. M. B., Gerdt, J. P., Wang, C., De Niz, M., Philip, N., Adapa, S. R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S. D., Laffitte, M.-C., Clark, M. A., Grüning, C., Ravel, D., Blancke Soares, A., Demas, A., Bopp, S., Rubio-Ruiz, B., Conejo-Garcia, A., Wirth, D. F., Gendaszewska-Darmach, E., Duraisingh, M. T., Adams, J. H., Voss, T. S., Waters, A. P., Jiang, R. H. Y., Clardy, J., Marti, M., Lysophosphatidylcholine regulates sexual stage differentiation in the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Cell* **171**, 1532-1544.e1515 (2017).
37. Broadbent, K. M., Broadbent, J. C., Ribacke, U., Wirth, D., Rinn, J. L., Sabeti, P. C., Strand-specific rna sequencing in plasmodium falciparum malaria identifies developmentally regulated long non-coding rna and circular rna. *BMC genomics* **16**, 1-22 (2015).
38. Bruce, M. C., Alano, P., Duthie, S., Carter, R., Commitment of the malaria parasite plasmodium falciparum to sexual and asexual development. *Parasitology* **100**, 191-200 (1990).
39. Bruce, M. C., Carter, R. N., Nakamura, K.-i., Aikawa, M., Carter, R., Cellular location and temporal expression of the plasmodium falciparum sexual stage antigen pfs16. *Molecular and Biochemical Parasitology* **65**, 11-22 (1994).
40. Buckling, A., Ranford-Cartwright, L., Miles, A., Read, A., Chloroquine increases plasmodium falciparum gametocytogenesis in vitro. *Parasitology* **118**, 339-346 (1999).
41. Bui, H. T., Passecker, A., Brancucci, N. M., Voss, T. S., Investigation of heterochromatin protein 1 function in the malaria parasite plasmodium falciparum using a conditional domain deletion and swapping approach. *Msphere* **6**, 10.1128/msphere.01220-01220 (2021).
42. Bunnik, E. M., Polishko, A., Prudhomme, J., Ponts, N., Gill, S. S., Lonardi, S., Le Roch, K. G., DNA-encoded nucleosome occupancy is associated with transcription levels in the human malaria parasite plasmodium falciparum. *BMC genomics* **15**, 1-15 (2014).
43. Burgess, B. R., Schuck, P., Garboczi, D. N., Dissection of merozoite surface protein 3, a representative of a family of plasmodium falciparum surface proteins, reveals an oligomeric and highly elongated molecule. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 37236-37245 (2005).
44. Burri, G., Parasitémie automatisée de la malaria à partir d'images microscopiques. (2016).
45. Burzyńska, P., Jodłowska, M., Zerka, A., Czujkowski, J., Jaśkiewicz, E., Red blood cells oligosaccharides as targets for plasmodium invasion. *Biomolecules* **12**, 1669 (2022).
46. Burzyńska, P., Sobala, Ł. F., Mikołajczyk, K., Jodłowska, M., Jaśkiewicz, E., Sialic acids as receptors for pathogens. *Biomolecules* **11**, 831 (2021).

47. Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Crosnier, C., Campos, M. G., Wanaguru, M., Nguon, C., Kwiatkowski, D. P., Wright, G. J., Rayner, J. C., A full-length recombinant plasmodium falciparum pfrh5 protein induces inhibitory antibodies that are effective across common pfrh5 genetic variants. *Vaccine* **31**, 373-379 (2013).
48. Campbell, T. L., De Silva, E. K., Olszewski, K. L., Elemento, O., Llinás, M., Identification and genome-wide prediction of DNA binding specificities for the apiap2 family of regulators from the malaria parasite. *PLOS Pathogens* **6**, e1001165 (2010).
49. Campeotto, I., Galaway, F., Mehmood, S., Barfod, L. K., Quinkert, D., Kotraiah, V., Phares, T. W., Wright, K. E., Snijders, A. P., Draper, S. J., The structure of the cysteine-rich domain of plasmodium falciparum p113 identifies the location of the rh5 binding site. *MBio* **11**, 10.1128/mbio.01566-01520 (2020).
50. Carter, R., Chen, D. H., Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite. *Nature* **263**, 57-60 (1976).
51. Chiu, C. Y., Hodder, A. N., Lin, C. S., Hill, D. L., Li Wai Suen, C. S., Schofield, L., Siba, P. M., Mueller, I., Cowman, A. F., Hansen, D. S., Antibodies to the plasmodium falciparum proteins mspdbl1 and mspdbl2 opsonize merozoites, inhibit parasite growth, and predict protection from clinical malaria. *The Journal of infectious diseases* **212**, 406-415 (2015).
52. Chou, H.-H., Takematsu, H., Diaz, S., Iber, J., Nickerson, E., Wright, K. L., Muchmore, E. A., Nelson, D. L., Warren, S. T., Varki, A., A mutation in human cmp-sialic acid hydroxylase occurred after the homo-pan divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 11751-11756 (1998).
53. Coleman, B. I., Skillman, K. M., Jiang, R. H., Childs, L. M., Altenhofen, L. M., Ganter, M., Leung, Y., Goldowitz, I., Kafsack, B. F., Marti, M., A plasmodium falciparum histone deacetylase regulates antigenic variation and gametocyte conversion. *Cell host & microbe* **16**, 177-186 (2014).
54. Collins, C. R., Das, S., Wong, E. H., Andenmatten, N., Stallmach, R., Hackett, F., Herman, J. P., Müller, S., Meissner, M., Blackman, M. J., Robust inducible cre recombinase activity in the human malaria parasite plasmodium falciparum enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Mol Microbiol* **88**, 687-701 (2013).
55. Comeaux, C. A., Coleman, B. I., Bei, A. K., Whitehurst, N., Duraisingh, M. T., Functional analysis of epigenetic regulation of tandem rhoph1/clag genes reveals a role in plasmodium falciparum growth. *Molecular microbiology* **80**, 378-390 (2011).
56. Consortium, U., Uniprot: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research* **47**, D506-D515 (2019).
57. Cortés, A., Carret, C., Kaneko, O., Yim Lim, B. Y., Ivens, A., Holder, A. A., Epigenetic silencing of plasmodium falciparum genes linked to erythrocyte invasion. *PLoS pathogens* **3**, e107 (2007).
58. Cortés, A., Deitsch, K. W., Malaria epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, (2017).
59. Cowman, A. F., Berry, D., Baum, J., The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol* **198**, 961-971 (2012).
60. Cowman, A. F., Crabb, B. S., Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**, 755-766 (2006).
61. Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W.-H., Duraisingh, M. T., The molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. *Cell host & microbe* **22**, 232-245 (2017).

62. Cox, F. E., History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors* **3**, 5 (2010).
63. Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., Wright, G. J., Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by plasmodium falciparum. *Nature* **480**, 534-537 (2011).
64. Crowley, V. M., Rovira-Graells, N., de Pouplana, L. R., Cortés, A., Heterochromatin formation in bistable chromatin domains controls the epigenetic repression of clonally variant plasmodium falciparum genes linked to erythrocyte invasion. *Molecular microbiology* **80**, 391-406 (2011).
65. Cui, L., Fan, Q., Cui, L., Miao, J., Histone lysine methyltransferases and demethylases in plasmodium falciparum. *Int J Parasitol* **38**, 1083-1097 (2008).
66. Culvenor, J., Day, K., Anders, R., Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infection and immunity* **59**, 1183-1187 (1991).
67. Dame, J. B., Williams, J. L., McCutchan, T. F., Weber, J. L., Wirtz, R. A., Hockmeyer, W. T., Maloy, W. L., Haynes, J. D., Schneider, I., Roberts, D., Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Science* **225**, 593-599 (1984).
68. Das, S., Hertrich, N., Perrin, A. J., Withers-Martinez, C., Collins, C. R., Jones, M. L., Watermeyer, J. M., Fobes, E. T., Martin, S. R., Saibil, H. R., Processing of plasmodium falciparum merozoite surface protein msp1 activates a spectrin-binding function enabling parasite egress from rbc. *Cell host & microbe* **18**, 433-444 (2015).
69. Day, C. J., Favuzza, P., Bielfeld, S., Haselhorst, T., Seefeldt, L., Hauser, J., Shewell, L. K., Flueck, C., Poole, J., Jen, F. E. C., Schäfer, A., Dangy, J.-P., Gilberger, T.-W., França, C. T., Duraisingh, M. T., Tamborrini, M., Brancucci, N. M. B., Grüning, C., Filarsky, M., Jennings, M. P., Pluschke, G., The essential malaria protein *cyrpa* targets glycans to invade erythrocytes. *Cell reports* **43**, (2024).
70. Day, K. P., Karamalis, F., Thompson, J., Barnes, D. A., Peterson, C., Brown, H., Brown, G. V., Kemp, D. J., Genes necessary for expression of a virulence determinant and for transmission of plasmodium falciparum are located on a 0.3-megabase region of chromosome 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8292-8296 (1993).
71. De Niz, M., Burda, P.-C., Kaiser, G., del Portillo, H. A., Spielmann, T., Frischknecht, F., Heussler, V. T., Progress in imaging methods: Insights gained into plasmodium biology. *Nature Reviews Microbiology* **15**, 37-54 (2017).
72. De Niz, M., Meibalan, E., Mejia, P., Ma, S., Brancucci, N. M., Agop-Nersesian, C., Mandt, R., Ngotho, P., Hughes, K. R., Waters, A. P., Plasmodium gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. *Science advances* **4**, eaat3775 (2018).
73. Deans, A.-M., Nery, S., Conway, D. J., Kai, O., Marsh, K., Rowe, J. A., Invasion pathways and malaria severity in kenyan plasmodium falciparum clinical isolates. *Infection and immunity* **75**, 3014-3020 (2007).
74. Dearnley, M. K., Yeoman, J. A., Hanssen, E., Kenny, S., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Tilley, L., Dixon, M. W., Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of plasmodium falciparum gametocytes. *Journal of cell science* **125**, 2053-2063 (2012).
75. Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E. A., Sinden, R. E., Leroy, D., The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of plasmodium: A comparative study with human and rodent parasites. *PLoS medicine* **9**, e1001169 (2012).

76. Dessailly, B. H., Redfern, O. C., Cuff, A. L., Orengo, C. A., Detailed analysis of function divergence in a large and diverse domain superfamily: Toward a refined protocol of function classification. *Structure* **18**, 1522-1535 (2010).
77. Dixon, M. W., Dearnley, M. K., Hanssen, E., Gilberger, T., Tilley, L., Shape-shifting gametocytes: How and why does p. Falciparum go banana-shaped? *Trends in parasitology* **28**, 471-478 (2012).
78. Dixon, M. W., Thompson, J., Gardiner, D. L., Trenholme, K. R., Sex in plasmodium: A sign of commitment. *Trends in parasitology* **24**, 168-175 (2008).
79. Dorn, A., Stoffel, R., Matile, H., Bubendorf, A., Ridley, R. G., Malarial haemozoin/ β -haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature* **374**, 269-271 (1995).
80. Douglas, A. D., Williams, A. R., Illingworth, J. J., Kamuyu, G., Biswas, S., Goodman, A. L., Wyllie, D. H., Crosnier, C., Miura, K., Wright, G. J., Long, C. A., Osier, F. H., Marsh, K., Turner, A. V., Hill, A. V. S., Draper, S. J., The blood-stage malaria antigen pfrh5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nature Communications* **2**, 601 (2011).
81. Dreyer, A. M., Beauchamp, J., Matile, H., Pluschke, G., An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells. *BMC Biotechnology* **10**, 87 (2010).
82. Dreyer, A. M., Matile, H., Papastogiannidis, P., Kamber, J., Favuzza, P., Voss, T. S., Wittlin, S., Pluschke, G., Passive immunoprotection of plasmodium falciparum-infected mice designates the cyrpa as candidate malaria vaccine antigen. *The Journal of Immunology* **188**, 6225-6237 (2012).
83. Dreyer, A. M., Matile, H., Papastogiannidis, P., Kamber, J., Favuzza, P., Voss, T. S., Wittlin, S., Pluschke, G., Passive immunoprotection of plasmodium falciparum-infected mice designates the cyrpa as candidate malaria vaccine antigen. *J Immunol* **188**, 6225-6237 (2012).
84. Duffy, M. F., Selvarajah, S. A., Josling, G. A., Petter, M., Epigenetic regulation of the plasmodium falciparum genome. *Briefings in Functional Genomics* **13**, 203-216 (2013).
85. Duffy, P. E., Fried, M., Plasmodium falciparum adhesion in the placenta. *Current opinion in microbiology* **6**, 371-376 (2003).
86. Duffy, P. E., Patrick Gorres, J., Malaria vaccines since 2000: Progress, priorities, products. *npj Vaccines* **5**, 48 (2020).
87. Duraisingh, M. T., Maier, A. G., Triglia, T., Cowman, A. F., Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in plasmodium falciparum utilizing sialic acid-dependent and-independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 4796-4801 (2003).
88. Duraisingh, M. T., Skillman, K. M., Epigenetic variation and regulation in malaria parasites. *Annual review of microbiology* **72**, 355-375 (2018).
89. Duraisingh, M. T., Triglia, T., Ralph, S. A., Rayner, J. C., Barnwell, J. W., McFadden, G. I., Cowman, A. F., Phenotypic variation of plasmodium falciparum merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *The EMBO journal* **22**, 1047-1057 (2003).
90. Dvorak, J. A., Miller, L. H., Whitehouse, W. C., Shiroishi, T., Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* **187**, 748-750 (1975).
91. Dyer, M., Day, K., Expression of plasmodium falciparum trimeric g proteins and their involvement in switching to sexual development. *Molecular and biochemical parasitology* **108**, 67-78 (2000).

92. Eksi, S., Morahan, B. J., Haile, Y., Furuya, T., Jiang, H., Ali, O., Xu, H., Kiattibutr, K., Suri, A., Czesny, B., Plasmodium falciparum gametocyte development 1 (pfgdv1) and gametocytogenesis early gene identification and commitment to sexual development. (2012).
93. El-Moamly, A. A., El-Sweify, M. A., Malaria vaccines: The 60-year journey of hope and final success—lessons learned and future prospects. *Tropical Medicine and Health* **51**, 29 (2023).
94. Fan, Q., An, L., Cui, L., *plasmodium falciparum* histone acetyltransferase, a yeast gcn5 homologue involved in chromatin remodeling. *Eukaryotic Cell* **3**, 264-276 (2004).
95. Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M., Buffet, P., The extravascular compartment of the bone marrow: A niche for plasmodium falciparum gametocyte maturation? *Malaria journal* **11**, 1-4 (2012).
96. Farrell, B., Alam, N., Hart, M., Jamwal, A., Ragotte, R., Walters-Morgan, H., Draper, S., Knuepfer, E., Higgins, M. K., Structure of the pfcr complex which bridges the malaria parasite and erythrocyte during invasion. *bioRxiv*, 2023.2001.2030.526221 (2023).
97. Farrell, B., Alam, N., Hart, M. N., Jamwal, A., Ragotte, R. J., Walters-Morgan, H., Draper, S. J., Knuepfer, E., Higgins, M. K., Structure of the pfcr complex which bridges the malaria parasite and erythrocyte during invasion. *bioRxiv*, 2023.2001.2030.526221 (2023).
98. Faust, C., Dobson, A. P., Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic plasmodium. *One Health* **1**, 66-75 (2015).
99. Favuzza, P., Blaser, S., Dreyer, A. M., Riccio, G., Tamborrini, M., Thoma, R., Matile, H., Pluschke, G., Generation of plasmodium falciparum parasite-inhibitory antibodies by immunization with recombinantly-expressed cyrpa. *Malar J* **15**, 161 (2016).
100. Favuzza, P., Blaser, S., Dreyer, A. M., Riccio, G., Tamborrini, M., Thoma, R., Matile, H., Pluschke, G., Generation of plasmodium falciparum parasite-inhibitory antibodies by immunization with recombinantly-expressed cyrpa. *Malaria journal* **15**, 1-14 (2016).
101. Favuzza, P., Guffart, E., Tamborrini, M., Scherer, B., Dreyer, A. M., Rufer, A. C., Erny, J., Hoernschemeyer, J., Thoma, R., Schmid, G., Structure of the malaria vaccine candidate antigen cyrpa and its complex with a parasite invasion inhibitory antibody. *Elife* **6**, e20383 (2017).
102. Favuzza, P., Guffart, E., Tamborrini, M., Scherer, B., Dreyer, A. M., Rufer, A. C., Erny, J., Hoernschemeyer, J., Thoma, R., Schmid, G., Gsell, B., Lamelas, A., Benz, J., Joseph, C., Matile, H., Pluschke, G., Rudolph, M. G., Structure of the malaria vaccine candidate antigen cyrpa and its complex with a parasite invasion inhibitory antibody. *eLife* **6**, e20383 (2017).
103. Filarsky, M., Frascchka, S. A., Niederwieser, I., Brancucci, N. M. B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., Voss, T. S., Gdv1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing hp1-dependent gene silencing. *Science* **359**, 1259-1263 (2018).
104. Fitch, C., Chevli, R., Banyal, H., Phillips, G., Pfaller, M., Krogstad, D., Lysis of plasmodium falciparum by ferriprotoporphyrin ix and a chloroquine-ferriprotoporphyrin ix complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **21**, 819-822 (1982).
105. Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacci, J. B., Tabb, D. L., Witney, A. A., Wolters, D., Wu, Y.,

- Gardner, M. J., Holder, A. A., Sinden, R. E., Yates, J. R., Carucci, D. J., A proteomic view of the plasmodium falciparum life cycle. *Nature* **419**, 520-526 (2002).
106. Flueck, C., Bartfai, R., Volz, J., Niederwieser, I., Salcedo-Amaya, A. M., Alako, B. T., Ehlgren, F., Ralph, S. A., Cowman, A. F., Bozdech, Z., Stunnenberg, H. G., Voss, T. S., Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 marks genomic loci linked to phenotypic variation of exported virulence factors. *PLoS Pathog* **5**, e1000569 (2009).
 107. Forni, D., Pontremoli, C., Cagliani, R., Pozzoli, U., Clerici, M., Sironi, M., Positive selection underlies the species-specific binding of plasmodium falciparum rh5 to human basigin. *Molecular Ecology* **24**, 4711-4722 (2015).
 108. Frasncka, S. A., Filarsky, M., Hoo, R., Niederwieser, I., Yam, X. Y., Brancucci, N. M., Mohring, F., Mushunje, A. T., Huang, X., Christensen, P. R., Comparative heterochromatin profiling reveals conserved and unique epigenome signatures linked to adaptation and development of malaria parasites. *Cell host & microbe* **23**, 407-420. e408 (2018).
 109. Freitas-Junior, L. H., Bottius, E., Pirrit, L. A., Deitsch, K. W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrbass, U., Wellem, T. E., Scherf, A., Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of p. Falciparum. *Nature* **407**, 1018-1022 (2000).
 110. Freitas-Junior, L. H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S. A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O. K., Rojas-Meza, A. P., Mancio-Silva, L., Leal-Silvestre, R. J., Gontijo, A. M., Shorte, S., Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell* **121**, 25-36 (2005).
 111. Freville, A., Stewart, L. B., Tetteh, K. K., Treeck, M., Cortes, A., Voss, T. S., Tarr, S. J., Baker, D. A., Conway, D., Expression of the mspdbl2 antigen in a discrete subset of plasmodium falciparum schizonts is regulated by gdv1 but not linked to sexual commitment. *bioRxiv*, 2023.2011.2021.568010 (2023).
 112. Galaway, F., Drought, L. G., Fala, M., Cross, N., Kemp, A. C., Rayner, J. C., Wright, G. J., P113 is a merozoite surface protein that binds the n terminus of plasmodium falciparum rh5. *Nature communications* **8**, 14333 (2017).
 113. Galinski, M. R., Ingravallo, P., Corredor-Medina, C., Al-Khedery, B., Pova, M., Barnwell, J. W., Plasmodium vivax merozoite surface proteins-3 β and-3 γ share structural similarities with p. Vivax merozoite surface protein-3 α and define a new gene family. *Molecular and biochemical parasitology* **115**, 41-53 (2001).
 114. Garcia, C. R., de Azevedo, M. F., Wunderlich, G., Budu, A., Young, J. A., Bannister, L., Plasmodium in the postgenomic era: New insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *International review of cell and molecular biology* **266**, 85-156 (2008).
 115. Garcia, L. S., Malaria. *Clin Lab Med* **30**, 93-129 (2010).
 116. Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Genome sequence of the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Nature* **419**, 498-511 (2002).
 117. Gaur, D., Furuya, T., Mu, J., Jiang, L.-b., Su, X.-z., Miller, L. H., Upregulation of expression of the reticulocyte homology gene 4 in the plasmodium falciparum clone dd2 is associated with a switch in the erythrocyte invasion pathway. *Molecular and biochemical parasitology* **145**, 205-215 (2006).
 118. Gaur, D., Singh, S., Singh, S., Jiang, L., Diouf, A., Miller, L. H., Recombinant plasmodium falciparum reticulocyte homology protein 4 binds to erythrocytes

- and blocks invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 17789-17794 (2007).
119. Geoghegan, N. D., Evelyn, C., Whitehead, L. W., Pasternak, M., McDonald, P., Triglia, T., Marapana, D. S., Kempe, D., Thompson, J. K., Mlodzianoski, M. J., Healer, J., Biro, M., Cowman, A. F., Rogers, K. L., 4d analysis of malaria parasite invasion offers insights into erythrocyte membrane remodeling and parasitophorous vacuole formation. *Nature Communications* **12**, 3620 (2021).
 120. Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., Smith, H. O., Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**, 343-345 (2009).
 121. Gilberger, T.-W., Thompson, J. K., Triglia, T., Good, R. T., Duraisingh, M. T., Cowman, A. F., A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from plasmodium falciparum defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 14480-14486 (2003).
 122. Gilson, P. R., Crabb, B. S., Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by plasmodium falciparum merozoites. *Int J Parasitol* **39**, 91-96 (2009).
 123. Gilson, P. R., Nebl, T., Vukcevic, D., Moritz, R. L., Sargeant, T., Speed, T. P., Schofield, L., Crabb, B. S., Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite plasmodium falciparum* s. *Molecular & cellular proteomics* **5**, 1286-1299 (2006).
 124. Goel, S., Palmkvist, M., Moll, K., Joannin, N., Lara, P., R Akhouri, R., Moradi, N., Öjemalm, K., Westman, M., Angeletti, D., Rifins are adhesins implicated in severe plasmodium falciparum malaria. *Nature medicine* **21**, 314-317 (2015).
 125. Goodman, C. D., Siregar, J. E., Mollard, V., Vega-Rodríguez, J., Syafruddin, D., Matsuoka, H., Matsuzaki, M., Toyama, T., Sturm, A., Cozijnsen, A., Parasites resistant to the antimalarial atovaquone fail to transmit by mosquitoes. *Science* **352**, 349-353 (2016).
 126. Grassi, B., *Studio di uno zoologo sulla malaria*. (R. Accademia dei lincei, 1900), vol. 3.
 127. Haase, S., Cabrera, A., Langer, C., Treeck, M., Struck, N., Herrmann, S., Jansen, P. W., Bruchhaus, I., Bachmann, A., Dias, S., Characterization of a conserved rhoptry-associated leucine zipper-like protein in the malaria parasite plasmodium falciparum. *Infection and immunity* **76**, 879-887 (2008).
 128. Haldar, K., Mohandas, N., Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Current opinion in hematology* **14**, 203-209 (2007).
 129. Hanssen, E., Knoechel, C., Dearnley, M., Dixon, M. W., Le Gros, M., Larabell, C., Tilley, L., Soft x-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of plasmodium falciparum. *Journal of structural biology* **177**, 224-232 (2012).
 130. Harvey, K. L., Gilson, P. R., Crabb, B. S., A model for the progression of receptor-ligand interactions during erythrocyte invasion by plasmodium falciparum. *Int J Parasitol* **42**, 567-573 (2012).
 131. Hill, A. V., Vaccines against malaria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **366**, 2806-2814 (2011).
 132. Hitz, E., Grüninger, O., Passecker, A., Wyss, M., Scheurer, C., Wittlin, S., Beck, H.-P., Brancucci, N. M. B., Voss, T. S., The catalytic subunit of plasmodium falciparum casein kinase 2 is essential for gametocytogenesis. *Communications Biology* **4**, 336 (2021).

133. Hocking, S. E., Stewart, L. B., Freville, A., Reid, A. J., Tarr, S. J., Tetteh, K. K. A., Flueck, C., Ahouidi, A. D., Amambua-Ngwa, A., Diakite, M., Awandare, G. A., Conway, D. J., Highly variable expression of merozoite surface protein mspdbl2 in diverse plasmodium falciparum clinical isolates and transcriptome scans for correlating genes. *mBio* **13**, e0194822 (2022).
134. Hodder, A. N., Czabotar, P. E., Uboldi, A. D., Clarke, O. B., Lin, C. S., Healer, J., Smith, B. J., Cowman, A. F., Insights into duffy binding-like domains through the crystal structure and function of the merozoite surface protein mspdbl2 from plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **287**, 32922-32939 (2012).
135. Hoeijmakers, Wieteke Anna M., Miao, J., Schmidt, S., Toenhake, C. G., Shrestha, S., Venhuizen, J., Henderson, R., Birnbaum, J., Ghidelli-Disse, S., Drewes, G., Cui, L., Stunnenberg, H. G., Spielmann, T., Bártfai, R., Epigenetic reader complexes of the human malaria parasite, plasmodium falciparum. *Nucleic Acids Research* **47**, 11574-11588 (2019).
136. Holder, A. A., Blackman, M. J., Borre, M., Burghaus, P. A., Chappel, J. A., Keen, J. K., Ling, I. T., Ogun, S. A., Owen, C. A., Sinha, K. A., Malaria parasites and erythrocyte invasion. *Biochemical Society Transactions* **22**, 291-295 (1994).
137. Hollin, T., Chahine, Z., Roch, K. G. L., Epigenetic regulation and chromatin remodeling in malaria parasites. *Annual Review of Microbiology* **77**, 255-276 (2023).
138. Hoo, R., Zhu, L., Amaladoss, A., Mok, S., Natalang, O., Lapp, S. A., Hu, G., Liew, K., Galinski, M. R., Bozdech, Z., Preiser, P. R., Integrated analysis of the plasmodium species transcriptome. *eBioMedicine* **7**, 255-266 (2016).
139. Horrocks, P., Wong, E., Russell, K., Emes, R. D., Control of gene expression in plasmodium falciparum - ten years on. *Mol Biochem Parasitol* **164**, 9-25 (2009).
140. Hu, G., Cabrera, A., Kono, M., Mok, S., Chaal, B. K., Haase, S., Engelberg, K., Cheemadan, S., Spielmann, T., Preiser, P. R., Transcriptional profiling of growth perturbations of the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Nature biotechnology* **28**, 91-98 (2010).
141. Ikadai, H., Shaw Saliba, K., Kanzok, S. M., McLean, K. J., Tanaka, T. Q., Cao, J., Williamson, K. C., Jacobs-Lorena, M., Transposon mutagenesis identifies genes essential for plasmodium falciparum gametocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E1676-1684 (2013).
142. Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., High efficiency transformation of escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
143. Inselburg, J., Gametocyte formation by the progeny of single plasmodium falciparum schizonts. *The Journal of parasitology*, 584-591 (1983).
144. Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., Suzuki, A., The molecular basis for the absence ofn-glycolylneuraminic acid in humans. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 15866-15871 (1998).
145. Jennings, C. V., Ahouidi, A. D., Zilversmit, M., Bei, A. K., Rayner, J., Sarr, O., Ndir, O., Wirth, D. F., Mboup, S., Duraisingh, M. T., Molecular analysis of erythrocyte invasion in plasmodium falciparum isolates from senegal. *Infection and immunity* **75**, 3531-3538 (2007).
146. Jiang, L., López-Barragán, M. J., Jiang, H., Mu, J., Gaur, D., Zhao, K., Felsenfeld, G., Miller, L. H., Epigenetic control of the variable expression of a plasmodium falciparum receptor protein for erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 2224-2229 (2010).

147. Jiang, L., Mu, J., Zhang, Q., Ni, T., Srinivasan, P., Rayavara, K., Yang, W., Turner, L., Lavstsen, T., Theander, T. G., Pfsetvs methylation of histone h3k36 represses virulence genes in plasmodium falciparum. *Nature* **499**, 223-227 (2013).
148. Joice, R., Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K. B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K. C., Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Science translational medicine* **6**, 244re245-244re245 (2014).
149. Josling, G. A., Russell, T. J., Venezia, J., Orchard, L., van Biljon, R., Painter, H. J., Llinás, M., Dissecting the role of pfap2-g in malaria gametocytogenesis. *Nat Commun* **11**, 1503 (2020).
150. Josling, G. A., Williamson, K. C., Llinás, M., Regulation of sexual commitment and gametocytogenesis in malaria parasites. *Annu Rev Microbiol* **72**, 501-519 (2018).
151. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Highly accurate protein structure prediction with alphafold. *Nature* **596**, 583-589 (2021).
152. Kafsack, B. F., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., Williams, A. E., Drought, L. G., Kwiatkowski, D. P., Baker, D. A., A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature* **507**, 248-252 (2014).
153. Kaneko, O., Fidock, D. A., Schwartz, O. M., Miller, L. H., Disruption of the c-terminal region of eba-175 in the dd2/nm clone of plasmodium falciparum does not affect erythrocyte invasion. *Molecular and biochemical parasitology* **110**, 135-146 (2000).
154. Kanyal, A., Rawat, M., Gurung, P., Choubey, D., Anamika, K., Karmodiya, K., Genome-wide survey and phylogenetic analysis of histone acetyltransferases and histone deacetylases of plasmodium falciparum. *The FEBS journal* **285**, 1767-1782 (2018).
155. Klein, E. Y., Smith, D. L., Laxminarayan, R., Levin, S., Superinfection and the evolution of resistance to antimalarial drugs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**, 3834-3842 (2012).
156. Knuepfer, E., Napiorkowska, M., van Ooij, C., Holder, A. A., Generating conditional gene knockouts in plasmodium - a toolkit to produce stable dicre recombinase-expressing parasite lines using crispr/cas9. *Sci Rep* **7**, 3881 (2017).
157. Knuepfer, E., Wright, K. E., Kumar Prajapati, S., Rawlinson, T. A., Mohring, F., Koch, M., Lyth, O. R., Howell, S. A., Villasis, E., Snijders, A. P., Moon, R. W., Draper, S. J., Rosanas-Urgell, A., Higgins, M. K., Baum, J., Holder, A. A., Divergent roles for the rh5 complex components, cyrpa and ripr in human-infective malaria parasites. *PLOS Pathogens* **15**, e1007809 (2019).
158. Koella, J. C., Antia, R., Optimal pattern of replication and transmission for parasites with two stages in their life cycle. *Theoretical Population Biology* **47**, 277-291 (1995).
159. Kucharski, M., Tripathi, J., Nayak, S., Zhu, L., Wirjanata, G., van der Pluijm, R. W., Dhorda, M., Dondorp, A., Bozdech, Z., A comprehensive rna handling and transcriptomics guide for high-throughput processing of plasmodium blood-stage samples. *Malar J* **19**, 363 (2020).
160. Labun, K., Montague, T. G., Gagnon, J. A., Thyme, S. B., Valen, E., Chopchop v2: A web tool for the next generation of crispr genome engineering. *Nucleic acids research* **44**, W272-W276 (2016).
161. Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., Valen, E., Chopchop v3: Expanding the crispr web toolbox beyond genome editing. *Nucleic acids research* **47**, W171-W174 (2019).

162. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
163. Langreth, S. G., Jensen, J. B., Reese, R. T., Trager, W., Fine structure of human malaria in vitro. *The Journal of protozoology* **25**, 443-452 (1978).
164. Lasonder, E., Rijpma, S. R., van Schaijk, B. C., Hoeijmakers, W. A., Kensche, P. R., Gresnigt, M. S., Italiaander, A., Vos, M. W., Woestenenk, R., Bousema, T., Integrated transcriptomic and proteomic analyses of p. Falciparum gametocytes: Molecular insight into sex-specific processes and translational repression. *Nucleic acids research* **44**, 6087-6101 (2016).
165. Laurens, M. B., Rts, s/as01 vaccine (mosquirix™): An overview. *Human vaccines & immunotherapeutics* **16**, 480-489 (2020).
166. Lavazec, C., Sanyal, S., Templeton, T. J., Expression switching in the stevor and pfmc-2tm superfamilies in plasmodium falciparum. *Molecular microbiology* **64**, 1621-1634 (2007).
167. Laveran, A., *Un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre: Origine parasitaire des accidents de l'impaludisme.* (1881).
168. Laveran, A., *Traité des fièvres palustres.* (Octave Doin, 1884).
169. Le Roch, K. G., Zhou, Y., Blair, P. L., Grainger, M., Moch, J. K., Haynes, J. D., De la Vega, P., Holder, A. A., Batalov, S., Carucci, D. J., Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* **301**, 1503-1508 (2003).
170. Lewis, T. E., Sillitoe, I., Dawson, N., Lam, S. D., Clarke, T., Lee, D., Orengo, C., Lees, J., Gene3d: Extensive prediction of globular domains in proteins. *Nucleic acids research* **46**, D435-D439 (2018).
171. Li, X.-Z., Zhang, L., Poole, K., Role of the multidrug efflux systems of pseudomonas aeruginosa in organic solvent tolerance. *Journal of bacteriology* **180**, 2987-2991 (1998).
172. Lin, C. S., Uboldi, A. D., Marapana, D., Czabotar, P. E., Epp, C., Bujard, H., Taylor, N. L., Perugini, M. A., Hodder, A. N., Cowman, A. F., The merozoite surface protein 1 complex is a platform for binding to human erythrocytes by plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **289**, 25655-25669 (2014).
173. Llorà-Batlle, O., Michel-Todó, L., Witmer, K., Toda, H., Fernández-Becerra, C., Baum, J., Cortés, A., Conditional expression of pfap2-g for controlled massive sexual conversion in plasmodium falciparum. *Science advances* **6**, eaaz5057 (2020).
174. Lobo, C.-A., Rodriguez, M., Reid, M., Lustigman, S., Glycophorin c is the receptor for the plasmodium falciparum erythrocyte binding ligand pfebp-2 (baebl). *Blood* **101**, 4628-4631 (2003).
175. Lopaticki, S., Maier, A. G., Thompson, J., Wilson, D. W., Tham, W.-H., Triglia, T., Gout, A., Speed, T. P., Beeson, J. G., Healer, J., Reticulocyte and erythrocyte binding-like proteins function cooperatively in invasion of human erythrocytes by malaria parasites. *Infection and immunity* **79**, 1107-1117 (2011).
176. López-Barragán, M. J., Lemieux, J., Quiñones, M., Williamson, K. C., Molina-Cruz, A., Cui, K., Barillas-Mury, C., Zhao, K., Su, X. Z., Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of plasmodium falciparum. *BMC Genomics* **12**, 587 (2011).
177. Lopez-Rubio, J.-J., Mancio-Silva, L., Scherf, A., Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in malaria parasites. *Cell Host Microbe* **5**, 179-190 (2009).
178. Loy, D. E., Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Plenderleith, L. J., Sundararaman, S. A., Sharp, P. M., Hahn, B. H., Out of africa: Origins and evolution of the human malaria

- parasites plasmodium falciparum and plasmodium vivax. *Int J Parasitol* **47**, 87-97 (2017).
179. Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F., Tilley, L., Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 341-354 (2009).
 180. Maier, A. G., Duraisingh, M. T., Reeder, J. C., Patel, S. S., Kazura, J. W., Zimmerman, P. A., Cowman, A. F., Plasmodium falciparum erythrocyte invasion through glycophorin c and selection for gerbich negativity in human populations. *Nature medicine* **9**, 87-92 (2003).
 181. Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H., Quivy, J.-P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., Almouzni, G., Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an rna component. *Nature genetics* **30**, 329-334 (2002).
 182. Manske, M., Miotto, O., Campino, S., Auburn, S., Almagro-Garcia, J., Maslen, G., O'Brien, J., Djimde, A., Doumbo, O., Zongo, I., Analysis of plasmodium falciparum diversity in natural infections by deep sequencing. *Nature* **487**, 375-379 (2012).
 183. Martin, M. J., Rayner, J. C., Gagneux, P., Barnwell, J. W., Varki, A., Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: Relationship to human genetic loss of *N*-glycolylneuraminic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 12819-12824 (2005).
 184. Martin, M. J., Rayner, J. C., Gagneux, P., Barnwell, J. W., Varki, A., Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: Relationship to human genetic loss of *N*-glycolylneuraminic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 12819-12824 (2005).
 185. Matelska, D., Steczkiewicz, K., Ginalska, K., Comprehensive classification of the pin domain-like superfamily. *Nucleic Acids Research* **45**, 6995-7020 (2017).
 186. Matuschewski, K., Vaccines against malaria—still a long way to go. *The FEBS journal* **284**, 2560-2568 (2017).
 187. Mayer, D. G., Cofie, J., Jiang, L., Hartl, D. L., Tracy, E., Kabat, J., Mendoza, L. H., Miller, L. H., Glycophorin b is the erythrocyte receptor of plasmodium falciparum erythrocyte-binding ligand, ebl-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 5348-5352 (2009).
 188. Mayer, D. G., Kaneko, O., Hudson-Taylor, D. E., Reid, M. E., Miller, L. H., Characterization of a plasmodium falciparum erythrocyte-binding protein paralogous to eba-175. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 5222-5227 (2001).
 189. Mayor, A., Alano, P., Bone marrow reticulocytes: A plasmodium vivax affair? *Blood* **125**, 1203-1205 (2015).
 190. McDonald, J., Merrick, C. J., DNA replication dynamics during erythrocytic schizogony in the malaria parasites plasmodium falciparum and plasmodium knowlesi. *PLoS Pathog* **18**, e1010595 (2022).
 191. Ménard, R., Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., Amino, R., Looking under the skin: The first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 701-712 (2013).
 192. Merrick, C. J., Duraisingh, M. T., Epigenetics in plasmodium: What do we really know? *Eukaryotic cell* **9**, 1150-1158 (2010).
 193. Merrick, C. J., Dzikowski, R., Imamura, H., Chuang, J., Deitsch, K., Duraisingh, M. T., The effect of plasmodium falciparum sir2a histone deacetylase on clonal and longitudinal variation in expression of the var family of virulence genes. *Int J Parasitol* **40**, 35-43 (2010).

194. Miao, J., Fan, Q., Cui, L., Li, J., Li, J., Cui, L., The malaria parasite plasmodium falciparum histones: Organization, expression, and acetylation. *Gene* **369**, 53-65 (2006).
195. Mikolajczyk, K., Kaczmarek, R., Czerwinski, M., How glycosylation affects glycosylation: The role of n-glycans in glycosyltransferase activity. *Glycobiology* **30**, 941-969 (2020).
196. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., Steinegger, M., Colabfold: Making protein folding accessible to all. *Nature Methods* **19**, 679-682 (2022).
197. Modrzynska, K., Pfander, C., Chappell, L., Yu, L., Suarez, C., Dundas, K., Gomes, A. R., Goulding, D., Rayner, J. C., Choudhary, J., Billker, O., A knockout screen of apiap2 genes reveals networks of interacting transcriptional regulators controlling the plasmodium life cycle. *Cell Host & Microbe* **21**, 11-22 (2017).
198. Moll, K., Palmkvist, M., Ch'ng, J., Kiwuwa, M. S., Wahlgren, M., Evasion of immunity to plasmodium falciparum: Rosettes of blood group a impair recognition of pfemp1. *PLoS One* **10**, e0145120 (2015).
199. Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M., Valen, E., Chopchop: A crispr/cas9 and talen web tool for genome editing. *Nucleic acids research* **42**, W401-W407 (2014).
200. Moorthy, V. S., Good, M. F., Hill, A. V., Malaria vaccine developments. *The lancet* **363**, 150-156 (2004).
201. Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Rodriguez, A., Migration of plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* **291**, 141-144 (2001).
202. Muchardt, C., Guillemé, M., Seeler, J. S., Trouche, D., Dejean, A., Yaniv, M., Coordinated methyl and rna binding is required for heterochromatin localization of mammalian hp1 α . *EMBO reports*, (2002).
203. Muchmore, E. A., Diaz, S., Varki, A., A structural difference between the cell surfaces of humans and the great apes. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists* **107**, 187-198 (1998).
204. Nguitragool, W., Bokhari, A. A., Pillai, A. D., Rayavara, K., Sharma, P., Turpin, B., Aravind, L., Desai, S. A., Malaria parasite clag genes determine nutrient uptake channel activity on infected red blood cells. *Cell* **145**, 665 (2011).
205. Niang, M., Yan Yam, X., Preiser, P. R., The plasmodium falciparum stevor multigene family mediates antigenic variation of the infected erythrocyte. *PLoS pathogens* **5**, e1000307 (2009).
206. Nikolaeva, D., Illingworth, J. J., Miura, K., Alanine, D. G., Brian, I. J., Li, Y., Fyfe, A. J., Da, D. F., Cohuet, A., Long, C. A., Functional characterization and comparison of plasmodium falciparum proteins as targets of transmission-blocking antibodies. *Molecular & Cellular Proteomics* **19**, 155-166 (2020).
207. Nussenzweig, R. S., Vanderberg, J., Most, H., Orton, C., Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. *Nature* **216**, 160-162 (1967).
208. Nyarko, P. B., Tarr, S. J., Aniweh, Y., Stewart, L. B., Conway, D. J., Awandare, G. A., Investigating a plasmodium falciparum erythrocyte invasion phenotype switch at the whole transcriptome level. *Scientific reports* **10**, 245 (2020).
209. O'Neill, M. T., Phuong, T., Healer, J., Richard, D., Cowman, A. F., Gene deletion from plasmodium falciparum using flp and cre recombinases: Implications for applied site-specific recombination. *Int J Parasitol* **41**, 117-123 (2011).

210. Ochola, L. I., Tetteh, K. K. A., Stewart, L. B., Riitho, V., Marsh, K., Conway, D. J., Allele frequency-based and polymorphism-versus-divergence indices of balancing selection in a new filtered set of polymorphic genes in *plasmodium falciparum*. *Molecular Biology and Evolution* **27**, 2344-2351 (2010).
211. Okie, S., Betting on a malaria vaccine. *The New England journal of medicine* **353**, 1877 (2005).
212. Omara-Opyene, A. L., Moura, P. A., Sulsona, C. R., Bonilla, J. A., Yowell, C. A., Fujioka, H., Fidock, D. A., Dame, J. B., Genetic disruption of the *plasmodium falciparum* digestive vacuole plasmepsins demonstrates their functional redundancy. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 54088-54096 (2004).
213. Ord, R. L., Rodriguez, M., Yamasaki, T., Takeo, S., Tsuboi, T., Lobo, C. A., Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in *plasmodium falciparum*. *PLOS ONE* **7**, e30251 (2012).
214. Organization, W. H., *World malaria report 2022*. (World Health Organization, 2022).
215. Orlandi, P. A., Klotz, F. W., Haynes, J. D., A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *plasmodium falciparum* recognizes the terminal neu5ac (α 2-3) gal-sequences of glycophorin a. *The Journal of cell biology* **116**, 901-909 (1992).
216. Payne, D., Spread of chloroquine resistance in *plasmodium falciparum*. *Parasitology today* **3**, 241-246 (1987).
217. Payne, R. O., Milne, K. H., Elias, S. C., Edwards, N. J., Douglas, A. D., Brown, R. E., Silk, S. E., Biswas, S., Miura, K., Roberts, R., Demonstration of the blood-stage *plasmodium falciparum* controlled human malaria infection model to assess efficacy of the p. *Falciparum* apical membrane antigen 1 vaccine, fmp2. 1/as01. *The Journal of infectious diseases* **213**, 1743-1751 (2016).
218. Payne, R. O., Silk, S. E., Elias, S. C., Miura, K., Diouf, A., Galaway, F., De Graaf, H., Brendish, N. J., Poulton, I. D., Griffiths, O. J., Human vaccination against rh5 induces neutralizing antimalarial antibodies that inhibit rh5 invasion complex interactions. *JCI insight* **2**, (2017).
219. Perez-Toledo, K., Rojas-Meza, A. P., Mancio-Silva, L., Hernandez-Cuevas, N. A., Delgadillo, D. M., Vargas, M., Martínez-Calvillo, S., Scherf, A., Hernandez-Rivas, R., *Plasmodium falciparum* heterochromatin protein 1 binds to tri-methylated histone 3 lysine 9 and is linked to mutually exclusive expression of var genes. *Nucleic acids research* **37**, 2596-2606 (2009).
220. Peri, S., Kulkarni, A., Feyertag, F., Berninsone, P. M., Alvarez-Ponce, D., Phylogenetic distribution of cmp-neu5ac hydroxylase (cmah), the enzyme synthetizing the proinflammatory human xenoantigen neu5gc. *Genome biology and evolution* **10**, 207-219 (2018).
221. Persson, K. E., McCallum, F. J., Reiling, L., Lister, N. A., Stubbs, J., Cowman, A. F., Marsh, K., Beeson, J. G., Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *The Journal of clinical investigation* **118**, 342-351 (2008).
222. Plenderleith, L. J., Liu, W., MacLean, O. A., Li, Y., Loy, D. E., Sundararaman, S. A., Bibollet-Ruche, F., Learn, G. H., Hahn, B. H., Sharp, P. M., Adaptive evolution of rh5 in ape *plasmodium* species of the *laverania* subgenus. *mBio* **9**, 10.1128/mbio.02237-02217 (2018).
223. Portugal, S., Drakesmith, H., Mota, M. M., Superinfection in malaria: *Plasmodium* shows its iron will. *EMBO reports* **12**, 1233-1242 (2011).

224. Rawat, M., Kanyal, A., Sahasrabudhe, A., Vembar, S. S., Lopez-Rubio, J. J., Karmodiya, K., Histone acetyltransferase pfpgcn5 regulates stress responsive and artemisinin resistance related genes in plasmodium falciparum. *Sci Rep* **11**, 852 (2021).
225. Reece, S. E., Ramiro, R. S., Nussey, D. H., Synthesis: Plastic parasites: Sophisticated strategies for survival and reproduction? *Evolutionary Applications* **2**, 11-23 (2009).
226. Reed, M. B., Caruana, S. R., Batchelor, A. H., Thompson, J. K., Crabb, B. S., Cowman, A. F., Targeted disruption of an erythrocyte binding antigen in plasmodium falciparum is associated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 7509-7514 (2000).
227. Roff, D., *Evolution of life histories: Theory and analysis*. (Springer Science & Business Media, 1993).
228. Ross, R., *The prevention of malaria*. (Dutton, 1910).
229. Rovira-Graells, N., Gupta, A. P., Planet, E., Crowley, V. M., Mok, S., De Pouplana, L. R., Preiser, P. R., Bozdech, Z., Cortés, A., Transcriptional variation in the malaria parasite plasmodium falciparum. *Genome research* **22**, 925-938 (2012).
230. RTS, S. C. T. P., A phase 3 trial of rts, s/as01 malaria vaccine in african infants. *New England Journal of Medicine* **367**, 2284-2295 (2012).
231. Safari, F., Zare, K., Negahdaripour, M., Barekati-Mowahed, M., Ghasemi, Y., Crispr cpf1 proteins: Structure, function and implications for genome editing. *Cell & Bioscience* **9**, 36 (2019).
232. Sakamoto, H., Takeo, S., Maier, A. G., Sattabongkot, J., Cowman, A. F., Tsuboi, T., Antibodies against a plasmodium falciparum antigen pfmspdbl1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. *Vaccine* **30**, 1972-1980 (2012).
233. Salcedo-Amaya, A. M., van Driel, M. A., Alako, B. T., Trelle, M. B., van den Elzen, A. M., Cohen, A. M., Janssen-Megens, E. M., van de Vegte-Bolmer, M., Selzer, R. R., Iniguez, A. L., Dynamic histone h3 epigenome marking during the intraerythrocytic cycle of plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 9655-9660 (2009).
234. Santos, J. M., Josling, G., Ross, P., Joshi, P., Orchard, L., Campbell, T., Schieler, A., Cristea, I. M., Llinás, M., Red blood cell invasion by the malaria parasite is coordinated by the pfap2-i transcription factor. *Cell host & microbe* **21**, 731-741. e710 (2017).
235. Scally, S. W., Triglia, T., Evelyn, C., Seager, B. A., Pasternak, M., Lim, P. S., Healer, J., Geoghegan, N. D., Adair, A., Tham, W.-H., Dagley, L. F., Rogers, K. L., Cowman, A. F., Pcr complex is essential for invasion of human erythrocytes by plasmodium falciparum. *Nature Microbiology* **7**, 2039-2053 (2022).
236. Schalch, T., Job, G., Noffsinger, V. J., Shanker, S., Kuscu, C., Joshua-Tor, L., Partridge, J. F., High-affinity binding of chp1 chromodomain to k9 methylated histone h3 is required to establish centromeric heterochromatin. *Molecular cell* **34**, 36-46 (2009).
237. Schalch, T., Job, G., Shanker, S., Partridge, J. F., Joshua-Tor, L., The chp1-tas3 core is a multifunctional platform critical for gene silencing by rits. *Nature structural & molecular biology* **18**, 1351-1357 (2011).
238. Schauer, R., Sialic acids: Fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology* **107**, 49-64 (2004).
239. Schauer, R., Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current opinion in structural biology* **19**, 507-514 (2009).
240. Schauer, R., Srinivasan, G. V., Wipfler, D., Kniep, B., Schwartz-Albiez, R., in *The molecular immunology of complex carbohydrates-3*. (Springer, 2011), pp. 525-548.

241. Scherf, A., Lopez-Rubio, J. J., Riviere, L., Antigenic variation in plasmodium falciparum. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 445-470 (2008).
242. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, 676-682 (2012).
243. Schlitzer, M., Medizinische chemie der wirkstoffe gegen malaria. Wirk-und resistenzmechanismen. *Pharmazie in unserer Zeit* **38**, 512-520 (2009).
244. Senissar, M., Manav, M. C., Brodersen, D. E., Structural conservation of the pin domain active site across all domains of life. *Protein Science* **26**, 1474-1492 (2017).
245. Shaw, L., Schauer, R., The biosynthesis of n-glycolylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the cmp-glycoside of n-acetylneuraminic acid. (1988).
246. Siciliano, G., Costa, G., Suárez-Cortés, P., Valleriani, A., Alano, P., Levashina, E. A., Critical steps of plasmodium falciparum ookinete maturation. *Frontiers in Microbiology* **11**, (2020).
247. Sidjanski, S., Vanderberg, J. P., Delayed migration of plasmodium sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **57**, 426-429 (1997).
248. Siegel, T. N., Hon, C.-C., Zhang, Q., Lopez-Rubio, J.-J., Scheidig-Benatar, C., Martins, R. M., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y., Scherf, A., Strand-specific rna-seq reveals widespread and developmentally regulated transcription of natural antisense transcripts in plasmodium falciparum. *BMC genomics* **15**, 1-16 (2014).
249. Sillitoe, I., Bordin, N., Dawson, N., Waman, V. P., Ashford, P., Scholes, H. M., Pang, C. S., Woodridge, L., Rauer, C., Sen, N., Cath: Increased structural coverage of functional space. *Nucleic acids research* **49**, D266-D273 (2021).
250. Silvestrini, F., Bozdech, Z., Lanfrancotti, A., Di Giulio, E., Bultrini, E., Picci, L., Derisi, J. L., Pizzi, E., Alano, P., Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology* **143**, 100-110 (2005).
251. Sim, B., Chitnis, C., Wasniowska, K., Hadley, T., Miller, L., Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by plasmodium falciparum. *Science* **264**, 1941-1944 (1994).
252. Sinden, R. E., The cell biology of sexual development in plasmodium. *Parasitology* **86 (Pt 4)**, 7-28 (1983).
253. Singh, S., Soe, S., Weisman, S., Barnwell, J. W., Pérignon, J. L., Druilhe, P., A conserved multi-gene family induces cross-reactive antibodies effective in defense against plasmodium falciparum. *PLOS ONE* **4**, e5410 (2009).
254. Singh, S. K., Hora, R., Belrhali, H., Chitnis, C. E., Sharma, A., Structural basis for duffy recognition by the malaria parasite duffy-binding-like domain. *Nature* **439**, 741-744 (2006).
255. Singh, S. K., Plieskatt, J., Chourasia, B. K., Singh, V., Bengtsson, K. L., Reimer, J. M., van Daalen, R. C., Teelen, K., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.-J., Jore, M. M., Theisen, M., Preclinical development of a pfs230-pfs48/45 chimeric malaria transmission-blocking vaccine. *npj Vaccines* **6**, 120 (2021).
256. Sinha, A., Hughes, K. R., Modrzynska, K. K., Otto, T. D., Pfander, C., Dickens, N. J., Religa, A. A., Bushell, E., Graham, A. L., Cameron, R., Kafsack, B. F. C., Williams, A. E., Llinás, M., Berriman, M., Billker, O., Waters, A. P., A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in plasmodium. *Nature* **507**, 253-257 (2014).

257. Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Okara, R. M., Van Boeckel, T., Godfray, H. C., Harbach, R. E., Hay, S. I., The dominant anopheles vectors of human malaria in africa, europe and the middle east: Occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors* **3**, 117 (2010).
258. Sirima, S. B., Cousens, S., Druilhe, P., Protection against malaria by msp3 candidate vaccine. *New England Journal of Medicine* **365**, 1062-1064 (2011).
259. Smalley, M., Abdalla, S., Brown, J., The distribution of plasmodium falciparum in the peripheral blood and bone marrow of gambian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **75**, 103-105 (1981).
260. Smith, L. M., Motta, F. C., Chopra, G., Moch, J. K., Nerem, R. R., Cummins, B., Roche, K. E., Kelliher, C. M., Leman, A. R., Harer, J., Gedeon, T., Waters, N. C., Haase, S. B., An intrinsic oscillator drives the blood stage cycle of the malaria parasite *plasmodium falciparum*. *Science* **368**, 754-759 (2020).
261. Spielmann, T., Montagna, G. N., Hecht, L., Matuschewski, K., Molecular make-up of the plasmodium parasitophorous vacuolar membrane. *International Journal of Medical Microbiology* **302**, 179-186 (2012).
262. Stearns, S. C., *The evolution of life histories*. (Oxford university press, 1998).
263. Stewart, L. B., Freville, A., Voss, T. S., Baker, D. A., Awandare, G. A., Conway, D. J., Plasmodium falciparum sexual commitment rate variation among clinical isolates and diverse laboratory-adapted lines. *Microbiology Spectrum* **10**, e02234-02222 (2022).
264. Storch, V., Welsch, U., Wink, M., *Evolutionsbiologie*. (Springer-Verlag, 2013).
265. Struck, N. S., de Souza Dias, S., Langer, C., Marti, M., Pearce, J. A., Cowman, A. F., Gilberger, T. W., Re-defining the golgi complex in plasmodium falciparum using the novel golgi marker pf grasp. *Journal of cell science* **118**, 5603-5613 (2005).
266. Stubbs, J., Simpson, K. M., Triglia, T., Plouffe, D., Tonkin, C. J., Duraisingh, M. T., Maier, A. G., Winzeler, E. A., Cowman, A. F., Molecular mechanism for switching of p. Falciparum invasion pathways into human erythrocytes. *Science* **309**, 1384-1387 (2005).
267. Sturm, A., Amino, R., Van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J. r.-M., Menard, R., Heussler, V. T., Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *science* **313**, 1287-1290 (2006).
268. Sundararaman, S. A., Plenderleith, L. J., Liu, W., Loy, D. E., Learn, G. H., Li, Y., Shaw, K. S., Ayoub, A., Peeters, M., Speede, S., Shaw, G. M., Bushman, F. D., Brisson, D., Rayner, J. C., Sharp, P. M., Hahn, B. H., Genomes of cryptic chimpanzee plasmodium species reveal key evolutionary events leading to human malaria. *Nature Communications* **7**, 11078 (2016).
269. Sutherland, C. J., Polley, S. D., in *Genetics and evolution of infectious diseases (second edition)*, Tibayrenc, M., Ed. (Elsevier, London, 2017), pp. 487-507.
270. Tan, M. S. Y., Blackman, M. J., Malaria parasite egress at a glance. *Journal of cell science* **134**, jcs257345 (2021).
271. Taniguchi, Y., Katayama, M., Ito, R., Takai, N., Kondo, T., Oyama, T., Laba: A novel gene required for negative feedback regulation of the cyanobacterial circadian clock protein kaic. *Genes & development* **21**, 60-70 (2007).
272. Taniguchi, Y., Nishikawa, T., Kondo, T., Oyama, T., Overexpression of lala, a paralog of laba, is capable of affecting both circadian gene expression and cell growth in the cyanobacterium synechococcus elongatus pcc 7942. *FEBS letters* **586**, 753-759 (2012).

273. Taylor, H. M., Grainger, M., Holder, A. A., Variation in the expression of a plasmodium falciparum protein family implicated in erythrocyte invasion. *Infection and immunity* **70**, 5779-5789 (2002).
274. Tetteh, K. K., Osier, F. H., Salanti, A., Kamuyu, G., Drought, L., Faily, M., Martin, C., Marsh, K., Conway, D. J., Analysis of antibodies to newly described plasmodium falciparum merozoite antigens supports mspdbl2 as a predicted target of naturally acquired immunity. *Infection and immunity* **81**, 3835-3842 (2013).
275. Tham, W.-H., Healer, J., Cowman, A. F., Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of plasmodium falciparum. *Trends in parasitology* **28**, 23-30 (2012).
276. Tham, W.-H., Wilson, D. W., Lopaticki, S., Schmidt, C. Q., Tetteh-Quarcoo, P. B., Barlow, P. N., Richard, D., Corbin, J. E., Beeson, J. G., Cowman, A. F., Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for plasmodium falciparum pfrh4 invasion ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 17327-17332 (2010).
277. Thera, M. A., Doumbo, O. K., Coulibaly, D., Laurens, M. B., Ouattara, A., Kone, A. K., Guindo, A. B., Traore, K., Traore, I., Kouriba, B., A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *New England Journal of Medicine* **365**, 1004-1013 (2011).
278. Thomas, J. A., Collins, C. R., Das, S., Hackett, F., Graindorge, A., Bell, D., Deu, E., Blackman, M. J., Development and application of a simple plaque assay for the human malaria parasite plasmodium falciparum. *PLOS ONE* **11**, e0157873 (2016).
279. Thommen, B. T., Passecker, A., Buser, T., Hitz, E., Voss, T. S., Brancucci, N., Revisiting the effect of pharmaceuticals on transmission stage formation in the malaria parasite plasmodium falciparum. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **12**, 802341 (2022).
280. Thomson, J., Robertson, A., The structure and development of plasmodium falciparum gametocytes in the internal organs and peripheral circulation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **29**, (1935).
281. Tibúrcio, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Kelly, G., Davies, H., Doerig, C., Billker, O., Voss, T. S., Treeck, M., A 39-amino-acid c-terminal truncation of gdv1 disrupts sexual commitment in plasmodium falciparum. *Mosphere* **6**, 10.1128/msphere. 01093-01020 (2021).
282. Tibúrcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P. A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P. H., A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of plasmodium falciparum transmission stages. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **119**, e172-e180 (2012).
283. Toenhake, C. G., Bártfai, R., What functional genomics has taught us about transcriptional regulation in malaria parasites. *Briefings in Functional Genomics* **18**, 290-301 (2019).
284. Toenhake, C. G., Fraschka, S. A.-K., Vijayabaskar, M. S., Westhead, D. R., van Heeringen, S. J., Bartfai, R., Chromatin accessibility-based characterization of the gene regulatory network underlying plasmodium falciparum blood-stage development. *Cell host & microbe* **23**, 557-569. e559 (2018).
285. Tolia, N. H., Enemark, E. J., Sim, B. K. L., Joshua-Tor, L., Structural basis for the eba-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite plasmodium falciparum. *Cell* **122**, 183-193 (2005).
286. Tonkin, M. L., Roques, M., Lamarque, M. H., Pugnère, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., Boulanger, M. J., Host cell invasion by apicomplexan parasites: Insights from the co-structure of ama1 with a ron2 peptide. *Science* **333**, 463-467 (2011).

287. TRAGER, W., GILL, G. S., Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by plasmodium falciparum in vitro. *The Journal of protozoology* **39**, 429-432 (1992).
288. Tu, Y., The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from chinese medicine. *Nature medicine* **17**, 1217-1220 (2011).
289. van Dooren, G. G., Marti, M., Tonkin, C. J., Stimmler, L. M., Cowman, A. F., McFadden, G. I., Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of plasmodium falciparum. *Molecular microbiology* **57**, 405-419 (2005).
290. van Kempen, M., Kim, S. S., Tumescheit, C., Mirdita, M., Lee, J., Gilchrist, C. L. M., Söding, J., Steinegger, M., Fast and accurate protein structure search with foldseek. *Nature Biotechnology*, (2023).
291. Van Tyne, D., Park, D. J., Schaffner, S. F., Neafsey, D. E., Angelino, E., Cortese, J. F., Barnes, K. G., Rosen, D. M., Lukens, A. K., Daniels, R. F., Identification and functional validation of the novel antimalarial resistance locus pf10_0355 in plasmodium falciparum. *PLoS genetics* **7**, e1001383 (2011).
292. Van Tyne, D., Uboldi, A. D., Healer, J., Cowman, A. F., Wirth, D. F., Modulation of pf10_0355 (mspdbl2) alters plasmodium falciparum response to antimalarial drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 2937-2941 (2013).
293. Varki, A., Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* **14**, 351-360 (2008).
294. Varki, A., Gagneux, P., Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1253**, 16-36 (2012).
295. Vasoo, S., Pritt, B. S., Molecular diagnostics and parasitic disease. *Clinics in laboratory medicine* **33**, 461-503 (2013).
296. Vega-Rodríguez, J., Ghosh, A. K., Kanzok, S. M., Dinglasan, R. R., Wang, S., Bongio, N. J., Kalume, D. E., Miura, K., Long, C. A., Pandey, A., Jacobs-Lorena, M., Multiple pathways for *plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, E492-E500 (2014).
297. Vembar, S. S., Scherf, A., Siegel, T. N., Noncoding rnas as emerging regulators of plasmodium falciparum virulence gene expression. *Current opinion in microbiology* **20**, 153-161 (2014).
298. Venugopal, K., Hentzschel, F., Valkiūnas, G., Marti, M., Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nature Reviews Microbiology* **18**, 177-189 (2020).
299. Vincensini, L., Fall, G., Berry, L., Blisnick, T., Breton, C. B., The rhoph complex is transferred to the host cell cytoplasm following red blood cell invasion by plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology* **160**, 81-89 (2008).
300. Vinetz, J. M., Plasmodium ookinete invasion of the mosquito midgut. *Curr Top Microbiol Immunol* **295**, 357-382 (2005).
301. Volz, J., Carvalho, T. G., Ralph, S. A., Gilson, P., Thompson, J., Tonkin, C. J., Langer, C., Crabb, B. S., Cowman, A. F., Potential epigenetic regulatory proteins localise to distinct nuclear sub-compartments in plasmodium falciparum. *Int J Parasitol* **40**, 109-121 (2010).
302. Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T., Whitehead, L. W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W.-H., Wilson, D., Essential role of the pfrh5/pfripr/cyrpa complex during plasmodium falciparum invasion of erythrocytes. *Cell host & microbe* **20**, 60-71 (2016).

303. Wahlgren, M., Carlson, J., Helmby, H., Hedlund, I., Treutiger, C.-J., Molecular mechanisms and biological importance of plasmodium falciparum erythrocyte rosetting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **87**, 323-329 (1992).
304. Wahlgren, M., Goel, S., Akhouri, R. R., Variant surface antigens of plasmodium falciparum and their roles in severe malaria. *Nature Reviews Microbiology* **15**, 479-491 (2017).
305. Wanaguru, M., Crosnier, C., Johnson, S., Rayner, J. C., Wright, G. J., Biochemical analysis of the plasmodium falciparum erythrocyte-binding antigen-175 (eba175)-glycophorin-a interaction: Implications for vaccine design*♦. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 32106-32117 (2013).
306. Wanaguru, M., Liu, W., Hahn, B. H., Rayner, J. C., Wright, G. J., Rh5-basigin interaction plays a major role in the host tropism of *plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 20735-20740 (2013).
307. Weiss, G. E., Crabb, B. S., Gilson, P. R., Overlaying molecular and temporal aspects of malaria parasite invasion. *Trends in parasitology* **32**, 284-295 (2016).
308. Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W.-H., de Jong, N. W., Harvey, K. L., Fowkes, F. J., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J., Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during plasmodium falciparum invasion of erythrocytes. *PLoS pathogens* **11**, e1004670 (2015).
309. Wickramarachchi, T., Cabrera, A. L., Sinha, D., Dhawan, S., Chandran, T., Devi, Y. S., Kono, M., Spielmann, T., Gilberger, T. W., Chauhan, V. S., Mohammed, A., A novel plasmodium falciparum erythrocyte binding protein associated with the merozoite surface, pfdblmsp. *Int J Parasitol* **39**, 763-773 (2009).
310. Williams, J., Stimulation of plasmodium falciparum gametocytogenesis by conditioned medium from parasite cultures. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **60**, 7-13 (1999).
311. Winter, G., Kawai, S., Haeggström, M., Kaneko, O., von Euler, A., Kawazu, S.-i., Palm, D., Fernandez, V., Wahlgren, M., Surfin is a polymorphic antigen expressed on plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1853-1863 (2005).
312. Witmer, K., Schmid, C. D., Brancucci, N. M. B., Luah, Y.-H., Preiser, P. R., Bozdech, Z., Voss, T. S., Analysis of subtelomeric virulence gene families in plasmodium falciparum by comparative transcriptional profiling. *Molecular Microbiology* **84**, 243-259 (2012).
313. Wong, W., Huang, R., Menant, S., Hong, C., Sandow, J. J., Birkinshaw, R. W., Healer, J., Hodder, A. N., Kanjee, U., Tonkin, C. J., Structure of plasmodium falciparum rh5-cyrpa-ripr invasion complex. *Nature* **565**, 118-121 (2019).
314. Wright, G. J., Rayner, J. C., Plasmodium falciparum erythrocyte invasion: Combining function with immune evasion. *PLoS pathogens* **10**, e1003943 (2014).
315. Wright, K. E., Hjerrild, K. A., Bartlett, J., Douglas, A. D., Jin, J., Brown, R. E., Illingworth, J. J., Ashfield, R., Clemmensen, S. B., de Jongh, W. A., Structure of malaria invasion protein rh5 with erythrocyte basigin and blocking antibodies. *Nature* **515**, 427-430 (2014).
316. Yuda, M., Iwanaga, S., Shigenobu, S., Kato, T., Kaneko, I., Transcription factor ap2-sp and its target genes in malarial sporozoites. *Molecular Microbiology* **75**, 854-863 (2010).
317. Yuda, M., Iwanaga, S., Shigenobu, S., Mair, G. R., Janse, C. J., Waters, A. P., Kato, T., Kaneko, I., Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. *Molecular Microbiology* **71**, 1402-1414 (2009).

318. Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., Van Der Oost, J., Regev, A., Cpf1 is a single rna-guided endonuclease of a class 2 crispr-cas system. *cell* **163**, 759-771 (2015).
319. Zhang, D., Burroughs, A. M., Vidal, N. D., Iyer, L. M., Aravind, L., Transposons to toxins: The provenance, architecture and diversification of a widespread class of eukaryotic effectors. *Nucleic acids research* **44**, 3513-3533 (2016).
320. Zhang, M., Wang, C., Otto, T. D., Oberstaller, J., Liao, X., Adapa, S. R., Udenze, K., Bronner, I. F., Casandra, D., Mayho, M., Brown, J., Li, S., Swanson, J., Rayner, J. C., Jiang, R. H. Y., Adams, J. H., Uncovering the essential genes of the human malaria parasite plasmodium falciparum by saturation mutagenesis. *Science* **360**, (2018).
321. Zhang, Y., Skolnick, J., Tm-align: A protein structure alignment algorithm based on the tm-score. *Nucleic acids research* **33**, 2302-2309 (2005).
322. Zheng, W., Zhang, C., Li, Y., Pearce, R., Bell, E. W., Zhang, Y., Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with i-tasser assembly simulations. *Cell Rep Methods* **1**, (2021).

Anhang

Tabelle 8 Sequenzen für die recodonisierten Teile der CyRPA Sequenzen inklusive der veränderten Codons für die spezifischen Mutationen

CyRPA Variante	Sequenz
CyRPA_recodonized	AAAGTTAAAGATTCATGGATTACATTAAATGATCTTTTCAAAGAAACAGA TTTAACTGGTAGACCACATATTTTTGCTTATGTTGATGTTGAAGAAATTA TAATTTTATTATGTGAAGATGAAGAATTTAGTAACAGAAAAAAGGATATG ACATGTCATAGATTTTATTCAAATGATGGTAAAGAATATAACAATTCAGA GATTACAATTTTCAGATTATATTTTAAAGGATAAATTGTTATCTTCATATG TTAGTCTTCCATTAAAAATAGAAAATAGAGAGTACTTTCTTATTTGTGGA GTTTCACCTTATAAGTTTAAAGACGATAATAAGAAGGACGATATATTATG TATGGCTTCACATGATAAAGGTGAGACTTGGGGAACATAAAATGTGATTA AATACGACAATTATAAATTAGGAGTCCAATATTTTTTCTTAGACCATAT ATTTCAAAGAACGATCTTAGTTTTCATTTTTATGTTGGAGATAATATTAA TAATGTTAAGAATGTAAATTTTATAGAATGTACACACGAAAAAGATTTAG AATTTGTATGTTCAAATCGTGATTTTTTAAAAGATAACAAAGTTTTGCAA GATGTATCAACTTTAAACGATGAATATATTGTATCATATGGTAATGATAA TAATTTTGCAGAATGTTATATTTTTTTTAATAACGAAAATAGTATTTTAA TTAAACCTGAAAAATATGGAAATACTACAGCTGGTTGTTATGGTGGTACC TTTGTTAAAATTGATGAAAACAGAACCTTATTTATTTATAGTTCTAGTCA AGGTATTTATAATATTCATACAATATATTACGCTAATTATGAGTAT
CyRPA_E148A	AAAGTTAAAGATTCATGGATTACATTAAATGATCTTTTCAAAGAAACAGA TTTAACTGGTAGACCACATATTTTTGCTTATGTTGATGTTGAAGAAATTA TAATTTTATTATGTGAAGATGAAGAATTTAGTAACAGAAAAAAGGATATG ACATGTCATAGATTTTATTCAAATGATGGTAAAGAATATAACAATTCAGC TATTACAATTTTCAGATTATATTTTAAAGGATAAATTGTTATCTTCATATG TTAGTCTTCCATTAAAAATAGAAAATAGAGAGTACTTTCTTATTTGTGGA GTTTCACCTTATAAGTTTAAAGACGATAATAAGAAGGACGATATATTATG TATGGCTTCACATGATAAAGGTGAGACTTGGGGAACATAAAATGTGATTA AATACGACAATTATAAATTAGGAGTCCAATATTTTTTCTTAGACCATAT ATTTCAAAGAACGATCTTAGTTTTCATTTTTATGTTGGAGATAATATTAA TAATGTTAAGAATGTAAATTTTATAGAATGTACACACGAAAAAGATTTAG AATTTGTATGTTCAAATCGTGATTTTTTAAAAGATAACAAAGTTTTGCAA GATGTATCAACTTTAAACGATGAATATATTGTATCATATGGTAATGATAA TAATTTTGCAGAATGTTATATTTTTTTTAATAACGAAAATAGTATTTTAA TTAAACCTGAAAAATATGGAAATACTACAGCTGGTTGTTATGGTGGTACC TTTGTTAAAATTGATGAAAACAGAACCTTATTTATTTATAGTTCTAGTCA AGGTATTTATAATATTCATACAATATATTACGCTAATTATGAGTAT
CyRPA_I149A	AAAGTTAAAGATTCATGGATTACATTAAATGATCTTTTCAAAGAAACAGA TTTAACTGGTAGACCACATATTTTTGCTTATGTTGATGTTGAAGAAATTA TAATTTTATTATGTGAAGATGAAGAATTTAGTAACAGAAAAAAGGATATG ACATGTCATAGATTTTATTCAAATGATGGTAAAGAATATAACAATTCAGA GGCTACAATTTTCAGATTATATTTTAAAGGATAAATTGTTATCTTCATATG TTAGTCTTCCATTAAAAATAGAAAATAGAGAGTACTTTCTTATTTGTGGA GTTTCACCTTATAAGTTTAAAGACGATAATAAGAAGGACGATATATTATG

	<p>TATGGCTTCACATGATAAAGGTGAGACTTGGGGAACATAAAATTGTGATTA AATACGACAATTATAAATTAGGAGTCCAATATTTTTTTCTTAGACCATAT ATTTCAAAGAACGATCTTAGTTTTTCATTTTTATGTTGGAGATAATATTAA TAATGTTAAGAATGTAAATTTTATAGAATGTACACACGAAAAAGATTTAG AATTTGTATGTTCAAATCGTGATTTTTTTAAAAGATAACAAAGTTTTTGCAA GATGTATCAACTTTAAACGATGAATATATTGTATCATATGGTAATGATAA TAATTTTGCAGAATGTTATATTTTTTTTAATAACGAAAATAGTATTTTTAA TTAAACCTGAAAAATATGGAAATACTACAGCTGGTTGTTATGGTGGTACC TTTGTTAAAATTGATGAAAACAGAACCTTATTTATTTATAGTTCTAGTCA AGGTATTTATAATATTCATACAATATATTACGCTAATTATGAGTAT</p>
CyRPA_S152A	<p>AAAGTTAAAGATTCATGGATTACATTAAATGATCTTTTCAAAGAAACAGA TTTAACTGGTAGACCACATATTTTTTGCTTATGTTGATGTTGAAGAAATTA TAATTTTATTATGTGAAGATGAAGAATTTAGTAACAGAAAAAGGATATG ACATGTCATAGATTTTATTCAAATGATGGTAAAGAATATAACAATTCAGA GATTACAATTGCTGATTATATTTTTAAAGGATAAAATTGTTATCTTCATATG TTAGTCTTCCATTAAAAATAGAAAATAGAGAGTACTTTCTTATTTGTGGA GTTTCACCTTATAAGTTTAAAGACGATAATAAGAAGGACGATATATTATG TATGGCTTCACATGATAAAGGTGAGACTTGGGGAACATAAAATTGTGATTA AATACGACAATTATAAATTAGGAGTCCAATATTTTTTTCTTAGACCATAT ATTTCAAAGAACGATCTTAGTTTTTCATTTTTATGTTGGAGATAATATTAA TAATGTTAAGAATGTAAATTTTATAGAATGTACACACGAAAAAGATTTAG AATTTGTATGTTCAAATCGTGATTTTTTTAAAAGATAACAAAGTTTTTGCAA GATGTATCAACTTTAAACGATGAATATATTGTATCATATGGTAATGATAA TAATTTTGCAGAATGTTATATTTTTTTTAATAACGAAAATAGTATTTTTAA TTAAACCTGAAAAATATGGAAATACTACAGCTGGTTGTTATGGTGGTACC TTTGTTAAAATTGATGAAAACAGAACCTTATTTATTTATAGTTCTAGTCA AGGTATTTATAATATTCATACAATATATTACGCTAATTATGAGTAT</p>
CyRPA_I155A	<p>AAAGTTAAAGATTCATGGATTACATTAAATGATCTTTTCAAAGAAACAGA TTTAACTGGTAGACCACATATTTTTTGCTTATGTTGATGTTGAAGAAATTA TAATTTTATTATGTGAAGATGAAGAATTTAGTAACAGAAAAAGGATATG ACATGTCATAGATTTTATTCAAATGATGGTAAAGAATATAACAATTCAGA GATTACAATTTTATGATTATGCTTTAAAGGATAAAATTGTTATCTTCATATG TTAGTCTTCCATTAAAAATAGAAAATAGAGAGTACTTTCTTATTTGTGGA GTTTCACCTTATAAGTTTAAAGACGATAATAAGAAGGACGATATATTATG TATGGCTTCACATGATAAAGGTGAGACTTGGGGAACATAAAATTGTGATTA AATACGACAATTATAAATTAGGAGTCCAATATTTTTTTCTTAGACCATAT ATTTCAAAGAACGATCTTAGTTTTTCATTTTTATGTTGGAGATAATATTAA TAATGTTAAGAATGTAAATTTTATAGAATGTACACACGAAAAAGATTTAG AATTTGTATGTTCAAATCGTGATTTTTTTAAAAGATAACAAAGTTTTTGCAA GATGTATCAACTTTAAACGATGAATATATTGTATCATATGGTAATGATAA TAATTTTGCAGAATGTTATATTTTTTTTAATAACGAAAATAGTATTTTTAA TTAAACCTGAAAAATATGGAAATACTACAGCTGGTTGTTATGGTGGTACC TTTGTTAAAATTGATGAAAACAGAACCTTATTTATTTATAGTTCTAGTCA AGGTATTTATAATATTCATACAATATATTACGCTAATTATGAGTAT</p>
CyRPA_S201A	<p>AAAGTTAAAGATTCATGGATTACATTAAATGATCTTTTCAAAGAAACAGA TTTAACTGGTAGACCACATATTTTTTGCTTATGTTGATGTTGAAGAAATTA TAATTTTATTATGTGAAGATGAAGAATTTAGTAACAGAAAAAGGATATG</p>

	<p>ACATGTCATAGATTTTATTCAAATGATGGTAAAGAATATAACAATTCAGA GATTACAATTTTCAGATTATATTTTAAAGGATAAAATTGTTATCTTCATATG TTAGTCTTCCATTAAAAATAGAAAATAGAGAGTACTTTCTTATTTGTGGA GTTTCACCTTATAAGTTTAAAGACGATAATAAGAAGGACGATATATTATG TATGGCTGCTCATGATAAAGGTGAGACTTGGGGAACATAAAATTGTGATTA AATACGACAATTATAAATTAGGAGTCCAATATTTTTTTCTTAGACCATAT ATTTCAAAGAACGATCTTAGTTTTTCATTTTTTATGTTGGAGATAATATTAA TAATGTTAAGAATGTAAATTTTATAGAATGTACACACGAAAAAGATTTAG AATTTGTATGTTCAAATCGTGATTTTTTAAAGATAACAAAGTTTTGCAA GATGTATCAACTTTAAACGATGAATATATTGTATCATATGGTAATGATAA TAATTTTGCAGAATGTTATATTTTTTTTAAATAACGAAAATAGTATTTTAA TTAAACCTGAAAAATATGGAAATACTACAGCTGGTTGTTATGGTGGTACC TTTGTTAAATTTGATGAAAACAGAACCTTATTTATTTATAGTTCTAGTCA AGGTATTTATAATATTCATACAATATATTACGCTAATTATGAGTAT</p>
CyRPA_G205A	<p>AAAGTTAAAGATTCATGGATTACATTAAATGATCTTTTCAAAGAAACAGA TTTAACTGGTAGACCACATATTTTTTGCTTATGTTGATGTTGAAGAAATTA TAATTTTATTATGTGAAGATGAAGAATTTAGTAACAGAAAAAGGATATG ACATGTCATAGATTTTATTCAAATGATGGTAAAGAATATAACAATTCAGA GATTACAATTTTCAGATTATATTTTAAAGGATAAAATTGTTATCTTCATATG TTAGTCTTCCATTAAAAATAGAAAATAGAGAGTACTTTCTTATTTGTGGA GTTTCACCTTATAAGTTTAAAGACGATAATAAGAAGGACGATATATTATG TATGGCTTCACATGATAAAGCTGAGACTTGGGGAACATAAAATTGTGATTA AATACGACAATTATAAATTAGGAGTCCAATATTTTTTTCTTAGACCATAT ATTTCAAAGAACGATCTTAGTTTTTCATTTTTTATGTTGGAGATAATATTAA TAATGTTAAGAATGTAAATTTTATAGAATGTACACACGAAAAAGATTTAG AATTTGTATGTTCAAATCGTGATTTTTTAAAGATAACAAAGTTTTGCAA GATGTATCAACTTTAAACGATGAATATATTGTATCATATGGTAATGATAA TAATTTTGCAGAATGTTATATTTTTTTTAAATAACGAAAATAGTATTTTAA TTAAACCTGAAAAATATGGAAATACTACAGCTGGTTGTTATGGTGGTACC TTTGTTAAATTTGATGAAAACAGAACCTTATTTATTTATAGTTCTAGTCA AGGTATTTATAATATTCATACAATATATTACGCTAATTATGAGTAT</p>
CyRPA_G209A	<p>AAAGTTAAAGATTCATGGATTACATTAAATGATCTTTTCAAAGAAACAGA TTTAACTGGTAGACCACATATTTTTTGCTTATGTTGATGTTGAAGAAATTA TAATTTTATTATGTGAAGATGAAGAATTTAGTAACAGAAAAAGGATATG ACATGTCATAGATTTTATTCAAATGATGGTAAAGAATATAACAATTCAGA GATTACAATTTTCAGATTATATTTTAAAGGATAAAATTGTTATCTTCATATG TTAGTCTTCCATTAAAAATAGAAAATAGAGAGTACTTTCTTATTTGTGGA GTTTCACCTTATAAGTTTAAAGACGATAATAAGAAGGACGATATATTATG TATGGCTTCACATGATAAAGGTGAGACTTGGGCTACTAAAATTGTGATTA AATACGACAATTATAAATTAGGAGTCCAATATTTTTTTCTTAGACCATAT ATTTCAAAGAACGATCTTAGTTTTTCATTTTTTATGTTGGAGATAATATTAA TAATGTTAAGAATGTAAATTTTATAGAATGTACACACGAAAAAGATTTAG AATTTGTATGTTCAAATCGTGATTTTTTAAAGATAACAAAGTTTTGCAA GATGTATCAACTTTAAACGATGAATATATTGTATCATATGGTAATGATAA TAATTTTGCAGAATGTTATATTTTTTTTAAATAACGAAAATAGTATTTTAA TTAAACCTGAAAAATATGGAAATACTACAGCTGGTTGTTATGGTGGTACC</p>

TTTGTAAATTTGATGAAAACAGAACCTTATTTATTTATAGTTCTAGTCA
AGGTATTTATAATATTCATACAATATATTACGCTAATTATGAGTAT

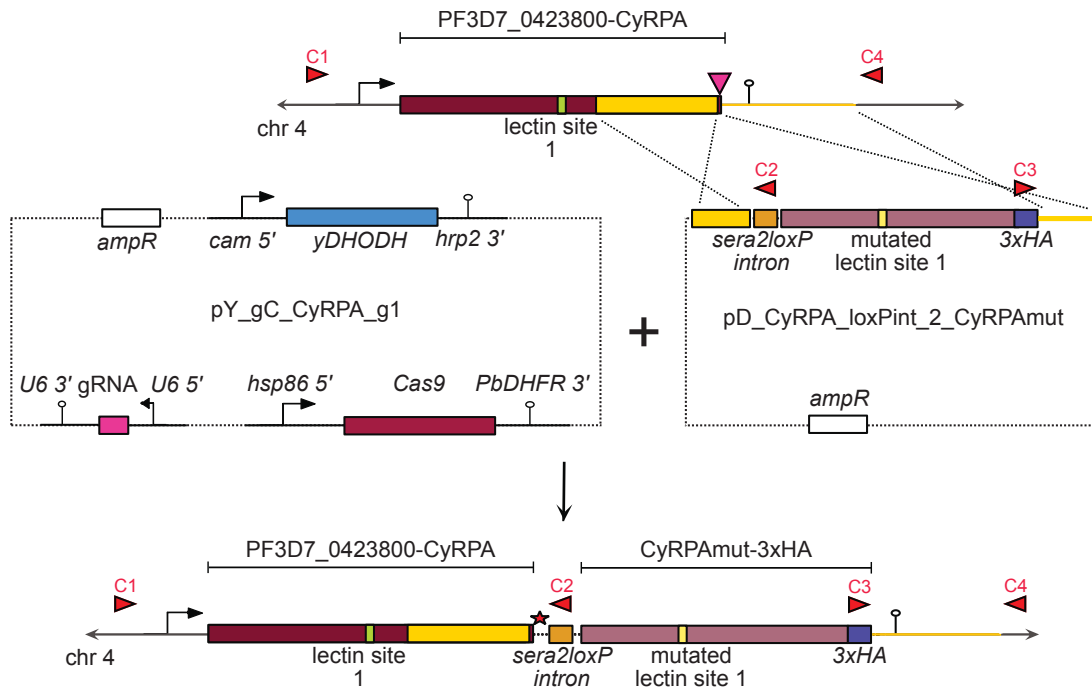


Abbildung 48 Schema zur Integration des ersten loxP Introns und der modifizierten Sequenz im CyRPA Locus mittels CRISPR/Cas. Mittels Transfektion wurden innerhalb der homologen Bereiche (gelb) zuerst ein loxP Intron (orange) gefolgt von der mutierten Sequenz (altrosa) und dem 3xHA-tag (lila). mit Hilfe der beiden Plasmide (pD_CyRPA_loxPint_2_CyRPAmut und pY_gC_CyRPA_g1) innerhalb der Zielsequenz (bordeaux) eingefügt. Die Bindestellen der gRNAs sind mit einem Dreieck (pink) gekennzeichnet und das Stop Codon mit einem Stern (rot).

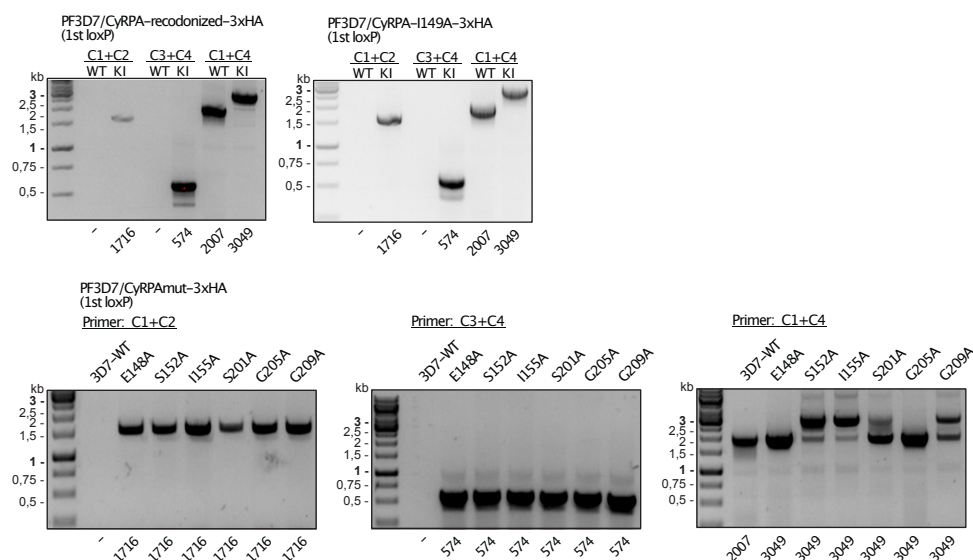
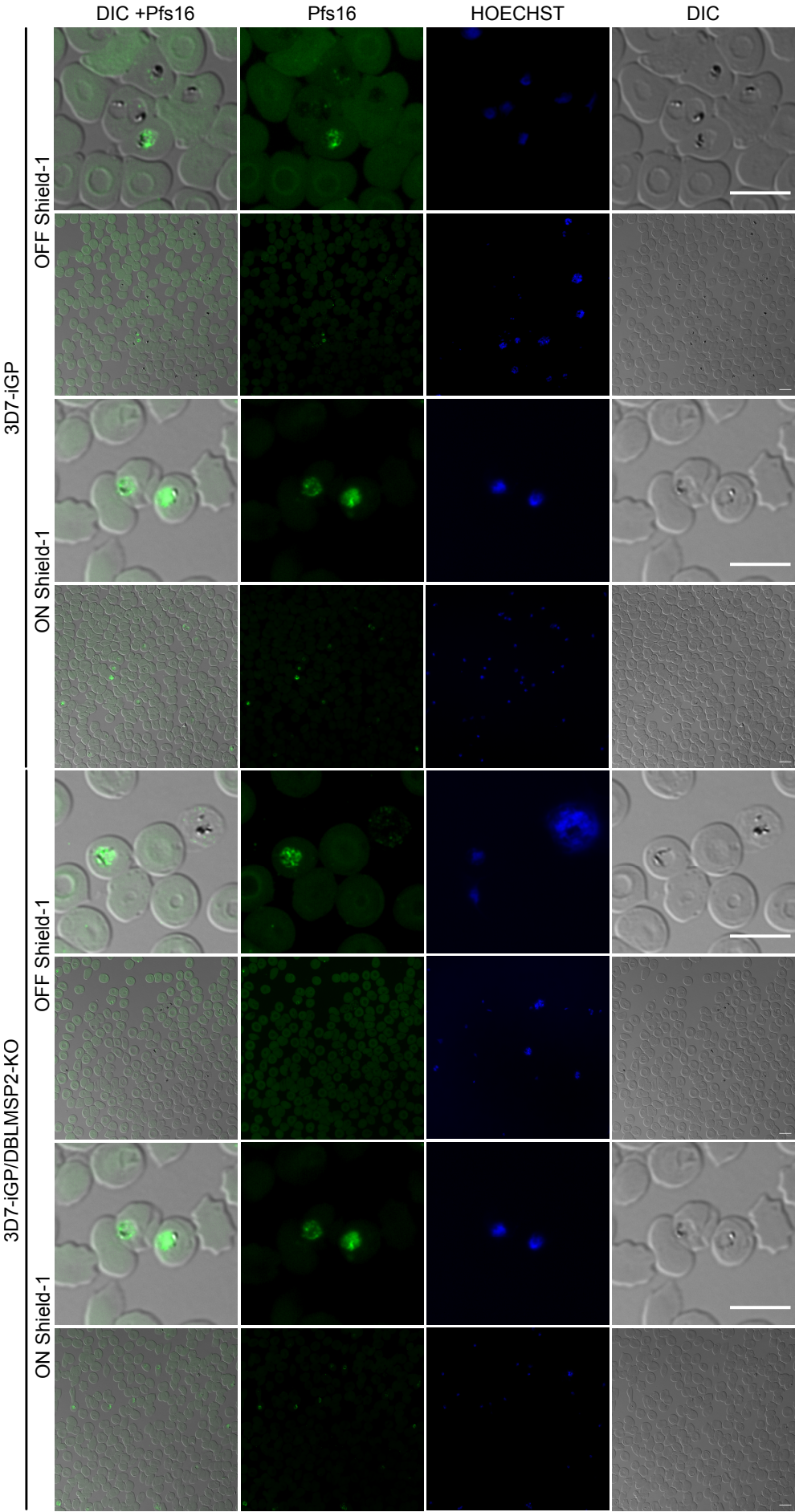


Abbildung 49 Integrations-PCR mit genomischer DNA der acht transgenen Parasitenlinien und WT-Parasiten zur Kontrolle der erfolgreichen Integration in das Parasitengenom. Bindestellen der verwendeten Primer sind im Schema in Abbildung 48 dargestellt (rote Dreiecke).



Anhang

Abbildung 50 IFA von 3D7-iGP und 3D7-iGP/DBLMS2 Parasiten +/- Shield-1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung Shield-1 behandelter (ON) und unbehandelter (OFF) Parasiten zum Nachweis des frühen Gametozytenmarkers Pfs16. Pfs16 wurde mit α -Pfs16 (grün) detektiert. Die Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt (blau). Maßstab= 10 μ m,

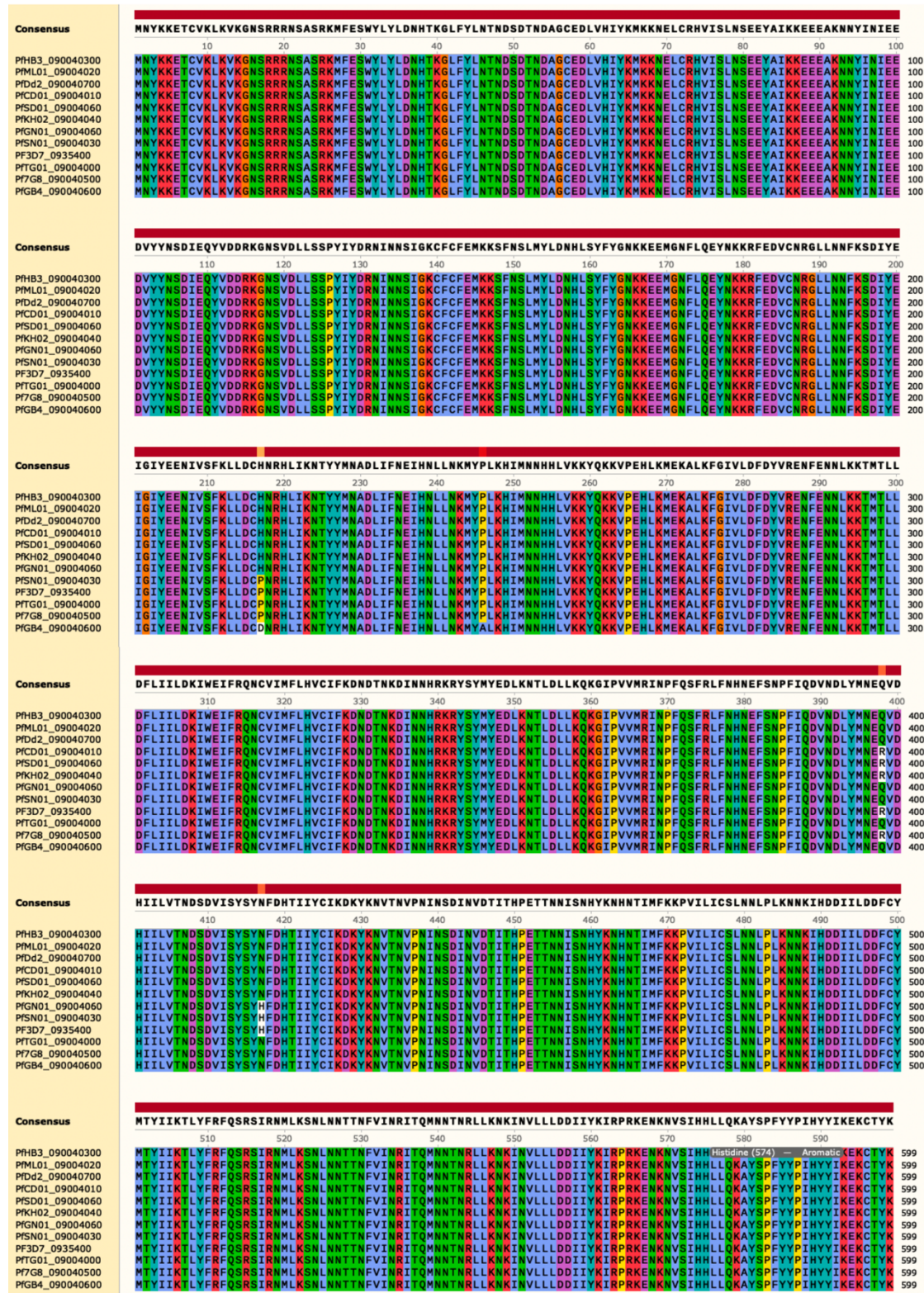


Abbildung 51 Sequenz-Alignment der 3D7 GDV1 Sequenz mit den P. falciparum Linien. Durchgeführt wurde ein globales Alignment mit Needleman-Wunsch-Algorithmus. Sequenzen der einzelnen

Linien wurden aus PlasmoDB genommen. Die Graphische Darstellung erfolgte mit SnapGene. Identische AS sind in schwarz dargestellt und abweichende in weiß unterlegt. Der Farbcode entspricht der in ClustalX verwendeten um Eigenschaften und Konservierungen deutlich zu machen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den Menschen entgegenbringen, die mich in den letzten Jahren bei meiner Promotion unterstützt haben, ohne deren Beitrag diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Michael Filarsky. Zum einen für die Möglichkeit Teil seiner Arbeitsgruppe zu sein und zum anderen für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit. Für konstruktive Kritik und die Unterstützung, auch wenn es zwischendrin nicht immer ganz einfach gewesen ist, und vor allem die Geduld und Mühe bis zum Schluss.

Selbstverständlich möchte ich auch Prof. Dr. Tim Gilberger danken, vor allem für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, nachdem Michael seine Wahlheimat von Hamburg nach Tübingen verlegt hat. Außerdem für die ebenfalls kompetente Betreuung, Vorschläge und Anregungen während der letzten Jahre.

Dem LFF für die Finanzierung des CeMeIn und somit der Realisierung meines Projektes. Auch möchte ich allen anderen Beteiligten des CeMeIn für die netten Gespräche während der Zusammenkünfte danken.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Gerd Pluschke danken dafür, dass er Michael das CyRPA Projekt aus Basel mit ins Gepäck gegeben hat und ich die Möglichkeit hatte an diesem spannenden Projekt mitzuwirken.

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Paul-Christian Burda, der mich durch meine Masterarbeit begleitet hat und mir die Grundlagen für die Arbeit mit *Plasmodium* beigebracht hat.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen vergangenen und aktuellen Mitgliedern der AG Gilberger bedanken, für die tolle Zusammenarbeit im Labor und Unterstützung. Hierbei möchte ich mich besonders bei Emma und Arne bedanken, die stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Besonders erwähnen und danken möchte ich Monja und Andrés, meinen beiden Mitstreitern in der AG Filarsky. Monja besonders ohne dich hätte ich es nicht geschafft. Liebe Monja vielen vielen Dank für die Hilfe und emotionale Unterstützung und vor allem den Riesenspass mit dir! Es war mir eine Ehre mit dir zusammen Lachen, Weinen und Fluchen zu dürfen.

Und zum Schluss möchte ich den größten Dank meinen Eltern und besten Freunden aussprechen, die immer an mich geglaubt haben und mich bedingungslos unterstützt

haben. Vielen Dank für die entgegengebrachte Liebe und das Verständnis der letzten Jahre ohne die ich niemals so weit gekommen wäre!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sabrina Bielfeld, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

I, Sabrina Bielfeld, hereby declare upon oath that I have written the present dissertation independently and have not used further resources and aids than those stated in the dissertation.

Hamburg, 20.04.2024



Erklärung zur Abgabe der Dissertation

Ich, Sabrina Bielfeld, versichere, dass dieses gebundene Exemplar der Dissertation und das in elektronischer Form eingereichte Dissertationsexemplar (über den Docata-Upload) sowie das bei der Fakultät (Studienbüro Biologie) zur Archivierung eingereichte gedruckte gebundene Exemplar der Dissertationsschrift identisch sind.

I, Sabrina Bielfeld, declare that this bound copy of the dissertation and the dissertation submitted in electronic form (via the Docata upload) and the printed bound copy of the dissertation submitted to the faculty (Academic Office Biology) for archiving are identical.

Hamburg, 20.04.2024

