

**Identifikation des Leberphasen-spezifisch exprimierten
Proteins PbLSA4 von *Plasmodium berghei*
(Vincke & Lips, 1948)
und Charakterisierung des *pblsa4*-Promotorbereichs**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades am
Department Biologie der
Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften der

Universität Hamburg

vorgelegt von
Sebastian Horstmann
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von PD Dr. Volker Heussler
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Professor Dr. Iris Bruchhaus
Tag der Disputation: 12. September 2008

Hamburg, den 29. August 2008




Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Die Betreuung der vorliegenden Dissertation wurde von PD Dr. Volker Heussler übernommen. Die experimentellen Arbeiten wurden von Mai 2004 bis Januar 2008 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in der Arbeitsgruppe Malaria I in Hamburg durchgeführt.

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium des Evangelischen Studienwerkes e.V. Villigst gefördert.

Erstgutachter: PD Dr. Volker Heussler

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Iris Bruchhaus

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	6
1. Einleitung	10
1.1 Malaria	10
1.2 Der Lebenszyklus von Plasmodien	11
1.3 Charakterisierung der Leberphase	12
1.4 Die Leberphase aus immunologischer Sicht.....	14
1.5 Der programmierte Zelltod	17
1.6 Proteinexport	18
1.7 Listeriolysin O (LLO)	19
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	21
2. Material & Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Chemikalien	24
2.1.4 Restriktionsendonukleasen	25
2.1.5 Spezielle Enzyme.....	25
2.1.6 Antikörper.....	26
2.1.7 Plasmide	26
2.1.8 Oligonukleotide.....	27
2.1.9 DNA/RNA-Aufreinigungssets	28
2.1.10 DNA-Marker & Protein-Marker.....	28
2.1.11 Zellen und Organismen	28
2.1.12 Puffer und Nährmedien.....	29
2.1.13 Sonstiges	31
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Kultivierung von <i>P. berghei</i>	31
2.2.2 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinie HepG2	32
2.2.2.1 Subkultivierung von HepG2-Zellen in 24-well-Platten	33
2.2.3 Fixierung und Färbung von HepG2-Zellen	33
2.2.3.1 Fixierung infizierter HepG2-Zellen	33
2.2.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung infizierter HepG2-Zellen	34
2.2.4 RNA-Isolation verschiedener <i>P. berghei</i> -Entwicklungsphasen.....	34
2.2.5 Saponinlyse	35
2.2.6 Isolierung genomischer DNA aus dem Blut infizierter Mäuse.....	36
2.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
2.2.8 Reverse Transcription-PCR (RT-PCR).....	37

Inhaltsverzeichnis

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.10 DNA-Reinigung	39
2.2.11 Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	39
2.2.12 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen.....	40
2.2.13 Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Format.....	40
2.2.13.1 Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Format mit Hilfe von Glasmilch	41
2.2.14 Präparation von Plasmid-DNA im Midi-Format.....	41
2.2.15 Insertion von DNA-Sequenzen in Plasmide	42
2.2.16 Einführung einer spezifischen Schnittstelle in eine Genregion (Mutagenese)	46
2.2.17 Durchführung eines Kontrollverdaus	47
2.2.18 Transfektion von Plasmiden in <i>P. berghei</i>	48
2.2.19 Kryokonservierung von infiziertem Mausblut	50
2.2.20 Proteinexpression in <i>E. coli</i> -BL21(rig)-Zellen.....	50
2.2.21 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
2.2.22 PREP-Cell-Verfahren.....	52
2.2.23 Fixierung und Färbung von SDS-PAGE-Gelen.....	53
2.2.24 Immunisierung von NMRI-Mäusen	53
2.2.25 Western-Blot-Analysen	54
2.2.26 Southern-Blot-Analysen als Integrationskontrolle.....	55
2.2.27 Herstellung einer spezifischen DNA-Sonde	56
3. Ergebnisse.....	57
3.1 <i>P. berghei</i> -Proteine mit Pexel-Motiv	57
3.2 Identifikation Leberphasen-spezifisch exprimierter mRNAs	58
3.2.1 RT-PCR-Analysen	58
3.2.2 Zeitverlauf der <i>pblsa4</i> -mRNA Expression	60
3.3 Klonierung des <i>pblsa4</i> -Gens in Expressionsplasmide	60
3.3.1 <i>PbLSA4</i> als GST-Fusionsprotein	60
3.3.2 <i>PbLSA4</i> als His-Fusionsprotein	62
3.3.3 Immunfluoreszenz-Analysen zur Detektion des <i>PbLSA4</i> -Proteins	64
3.4 Deletionsmutation des <i>pblsa4</i> -Gens.....	64
3.4.1 Nachweis der Plasmid-Integration mittels PCR	66
3.4.2 Nachweis der Plasmid-Integration mittels Southern-Blot-Analyse	67
3.4.3 Immunfluoreszenz-Analysen der Parasiten mit Insertion im <i>pblsa4</i> -Gen	68
3.5 Charakterisierung der Promotorregion des <i>pblsa4</i> -Gens	70
3.5.1 Eingrenzung der Promotorregion.....	72
3.6 Expression des <i>PbLSA4</i> -GFP-Fusionsproteins.....	73
3.6.1 Das <i>PbLSA4</i> -GFP-Fusionsprotein ko-lokalisiert mit dem endogenen <i>PbLSA4</i> -Protein	75
3.7 Expression von Listeriolysin unter der Kontrolle des <i>pblsa4</i> -Promotors.....	76
3.7.1 Expression von Listeriolysin als <i>PbLSA4</i> -Fusionsprotein	78
3.7.2 Fusion des <i>PbExp1</i> -Signalpeptids mit GFP	80
3.7.3 Expression von Listeriolysin mit dem <i>PbExp1</i> -Signalpeptid	81

4. Diskussion	83
4.1 Identifizierung eines sezernierten, Leberphasen-spezifischen Proteins.....	83
4.1.1 <i>Proteine mit Pexel-Motiv</i>	83
4.1.2 <i>Proteine mit Signalsequenz</i>	86
4.2 Sezernierung des Proteins PbLSA4	88
4.3 Mutation des Gens <i>pblsa4</i>	89
4.4 Charakterisierung eines Leberphasen-spezifischen Promotors	91
4.4.1 <i>Mögliche DNA/Protein-Wechselwirkungen und Deletionsanalysen in der Promotorregion von pblsa4</i>	92
4.5 Attenuierung des Parasiten	95
4.6 Expression des Proteins Listeriolysin O (LLO)	96
4.7 Mögliche Attenuierung von <i>P. falciparum</i> -Parasiten	101
Zusammenfassung	103
Literaturliste.....	105
Anhang	115
Danksagung.....	117

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Å	Ångström
A	Ampere
A. bidest.	zweimal destilliertes Wasser
<i>A. stephensi</i>	<i>Anopheles stephensi</i>
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APC	<i>antigen presenting cells</i>
APS	Ammonium-Persulfat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaNa ₂	Calcium-di-Natrium
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>cluster of differentiation 8</i>
CDC	<i>cholesterol dependent cytolysins</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadrat-Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxyd
CP	<i>cross presentation</i>
CPP	<i>cross presenting pathway</i>
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
CS (CSP)	<i>circumsporozoite protein</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Dinukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungen

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
et al.	et alibi (und andere)
<i>eef1α</i>	Elongationsfaktor 1 α
Exp1	<i>exported protein 1</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
g-Wert (x g)	mittlere Erdbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Gluthation-S-Transferase
h	<i>hour</i> (Stunde)
HCl	Hydrochlorid (Salzsäure)
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HepG2	<i>hepatocellular carcinoma cell line G2</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
<i>hlyA</i>	Hämolysin A (Genbezeichnung für LLO)
hpi	<i>hours post infection</i>
HRP	<i>horseradish</i> -Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
I- κ B	Inhibitor von Kappa-B
iNOS	<i>inducable nitric oxide synthase</i>
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KAHRP	<i>knob associated histidine rich protein</i>
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
<i>ko</i>	<i>knock-out</i>
LB	<i>Luria-broth</i>
LLO	Listeriolysin O
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LSA	<i>liver stage antigen</i>
M	Mol
mM	Millimol

Abkürzungen

mA	Milliampere
MACPF	<i>membrane-attack-complex/perforin</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
<i>Pb</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
Pexel	<i>protein export element</i>
PFA	Para-Formaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pMol	Picomol
PPM	Parasiten-Plasmamembran
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
<i>rifin</i>	<i>repetitive interspersed family</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR

Abkürzungen

S3	Sicherheitsstufe 3
SB	<i>Southern Blot</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sek	Sekunden
SERA	<i>serine repeat antigen</i>
SLARP	<i>sporozoite and liver stage asparagine rich protein</i>
<i>spect 1+2</i>	<i>sporozoite microneme protein essential for cell traversal</i>
<i>stevor</i>	<i>sub-telomeric variable open reading frame</i>
TAE	Tris-Acetyl-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
<i>trap</i>	<i>thrombospondin related protein</i>
T-Zellen	Thymus-Zellen
U	unit
<i>uis</i>	<i>upregulated in sporozoites</i>
UV	Ultraviolett
<i>var</i>	<i>variable gene family</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WT	Wild-Typ
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Malaria

Eine Infektion mit Protozoen der Gattung *Plasmodium* führt zu einem Krankheitsbild, das allgemein als Malaria bezeichnet wird. Beim Menschen sind drei Malaria-Arten bekannt: Die *Malaria tropica* wird durch die Infektion mit *Plasmodium falciparum* ausgelöst, während die *Malaria tertiana* durch *P. vivax* hervorgerufen wird. Diese Plasmodienarten sind weltweit am häufigsten vertreten. Ferner gibt es die *Malaria quartana*, für welche der Erreger *P. malariae* bzw. *P. ovale* verantwortlich ist. Neuere Studien haben gezeigt, dass der ursprünglich für Affen beschriebene Erreger *P. knowlesi* auch den Menschen infizieren und sich in ihm normal entwickeln kann (Cox-Singh et al., 2008). Bisherige *P. knowlesi*-Infektionen wurden fälschlicherweise als *P. malariae*-Infektionen diagnostiziert (Cox-Singh et al., 2008). Es existieren demnach zur Zeit fünf Plasmodien-Arten, die den Menschen infizieren können (White, 2008).

Die Ausbreitung von Plasmodien beschränkt sich heutzutage auf die Tropen und Subtropen. So treten Infektionen in Süd- und Mittelamerika, Afrika, dem Nahen sowie dem Fernen Osten auf. Die Übertragung des Erregers erfolgt durch weibliche *Anopheles*-Mücken.

Die Gattung *Plasmodium* zählt zum Stamm der Apikomplexa und umfasst nicht nur humanpathogene Erreger. Andere Plasmodienspezies können Primaten, Nagetiere, Vögel und Reptilien befallen. Eine besondere Rolle spielen die Nager-Parasiten *P. yoelii* und *P. berghei*, denn sie erzeugen bei Mäusen ein Malaria-ähnliches Krankheitsbild und werden daher als Labormodell genutzt.

Die Notwendigkeit der Erforschung des Parasiten wird angesichts der durch *P. falciparum* hervorgerufenen Infektionszahlen deutlich. Jährlich infizieren sich um die 500 Millionen Menschen mit dem Erreger. Rund 1 Millionen Menschen, darunter größtenteils Kinder unter fünf Jahren, sterben jedes Jahr an dieser Krankheit (Greenwood et al., 2008). Die Bekämpfung der Malaria in den Endemiegebieten wird durch zunehmende Resistenzbildung seitens der Parasiten z.B. gegen Chloroquin oder Pyrimethamin erheblich erschwert. In solchen Regionen sind nur noch die für die meisten Einwohner unerschwinglichen Medikamente wie z.B. Artemisinin-

1. Einleitung

Derivate oder Mefloquin wirksam. Zusätzlich entwickeln *Anopheles*-Mücken Resistenzen gegen verwendete Insektizide, so dass sich die Malariagebiete eher ausdehnen.

1.2 Der Lebenszyklus von Plasmodien

Der Lebenszyklus des Parasiten (siehe auch Abb.1.1) umfasst eine extrazelluläre sexuelle Phase im Mitteldarm der *Anopheles*-Mücke, in welcher sich männliche und weibliche Gameten zur einzigen diploiden Phase, dem mobilen Ookineten, vereinen. In dieser Form ist der Parasit fähig, die Zellen des Mitteldarmgewebes zu durchdringen und sich zwischen Mitteldarmepithel und Basallamina zur nicht-beweglichen Oozyste zu entwickeln (Osta et al., 2004). Nun folgen Meiose und asexuelle Stadien, die zur Bildung tausender haploider Sporozoiten pro Oozyste führen. Bei der anschließenden Freisetzung der Sporozoiten ist höchstwahrscheinlich eine SERA (*serine repeat antigen*) -Protease beteiligt (Aly and Matuschewski, 2005). In das Hämozoel der *Anopheles*-Mücke freigesetzte Sporozoiten gelangen zu den Speicheldrüsen, in die sie aktiv eindringen. Die sich dort ansammelnden Sporozoiten werden beim Stich der *Anopheles*-Mücke mit dem Mückenspeichel in das Hautgewebe des Wirtes injiziert. Von dort dringen etwa die Hälfte der Sporozoiten in Blutgefäße ein und erreichen mit dem Blutstrom die Leber (Amino et al., 2008). Hier durchdringen sie das Endothel sowie einige Hepatozyten, um dann schließlich, unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole, in einer Leberzelle zu verbleiben und die Leberphasen-Entwicklung einzuleiten.

Der in die Leberzelle eingedrungene Parasit entwickelt sich innerhalb von zwei Tagen zu 10.000-30.000 Merozoiten. Die infizierte Leberzelle löst sich dann aus dem Zellverband (Sturm et al., 2006). Mit Merozoiten gefüllte Vesikel, so genannte Merosomen, schnüren sich von der infizierten Leberzelle ab, gelangen in den Blutstrom (Sturm et al., 2006) und schließlich unbeschadet zur Lunge, wo sie akkumulieren und Merozoiten freigesetzt werden (Baer et al., 2007). Dort befallen die Merozoiten sofort rote Blutzellen. Innerhalb der Blutzelle entwickelt sich der Parasit über Ring-, Trophozoiten- und Schizontenstadium zu 16-32 neuen Merozoiten, die nach Lyse der infizierten Blutzelle frei werden und sofort neue Blutzellen befallen. Im Falle hoher Parasitämie kommt es auch zur Mehrfach-Infektion einer Wirtszelle.

1. Einleitung

Einige Parasiten entwickeln sich in roten Blutzellen zu weiblichen und männlichen Gamonten, die einige Zeit im Blut verweilen, bis sie durch den Stich einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden. Nach der Entwicklung zu Gameten erfolgt die Vereinigung zum Ookineten im Lumen des Mitteldarms.

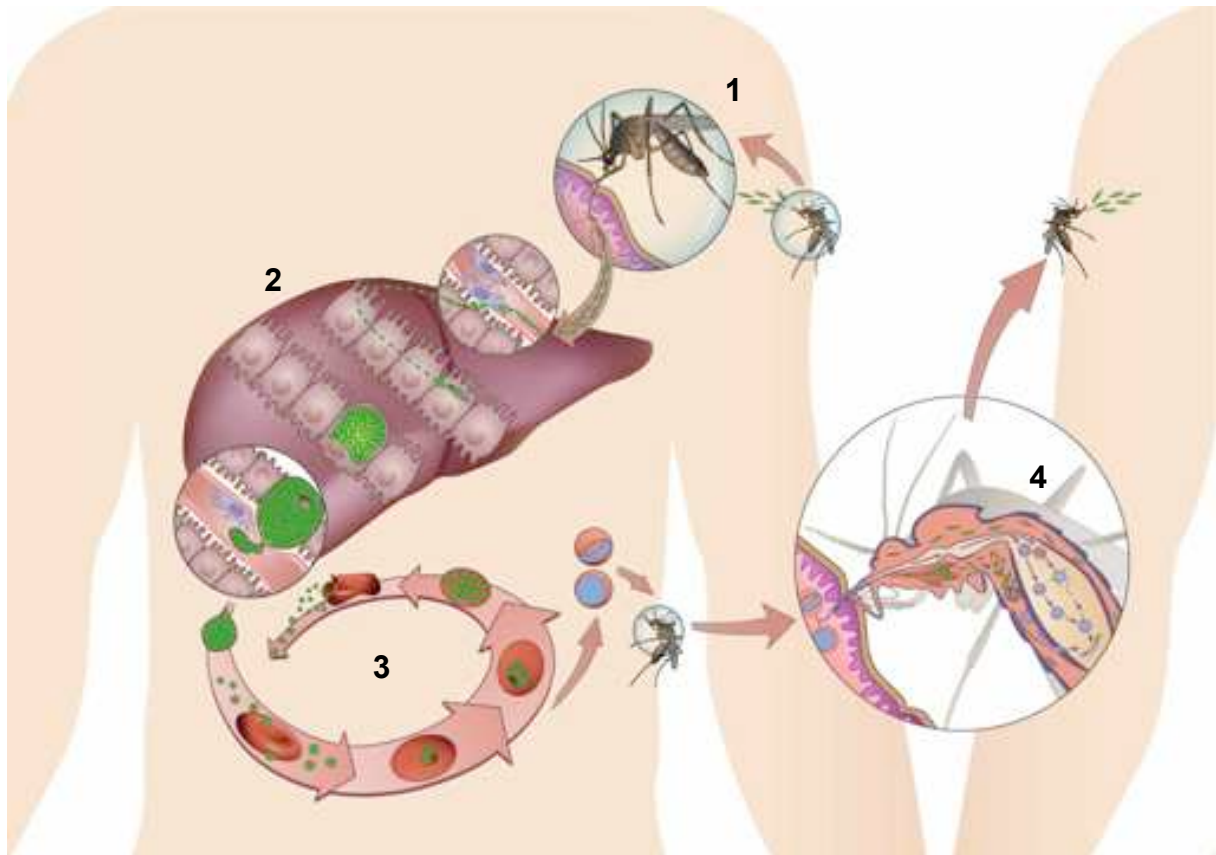


Abb.1.1: Der Lebenszyklus von *Plasmodium* 1 Eine infizierte *Anopheles*-Mücke überträgt beim Stich Sporozoiten. 2 Sporozoiten erreichen mit dem Blutstrom die Leber, gleiten an den Endothelzellen entlang, durchdringen Kupfer- und Leberzellen und entwickeln sich schließlich in einer Leberzelle. Nach Merozoitenformation ragen die Merosomen in den Lebersinusoid. 3 Aus dem Merosom entlassene Merozoiten befallen rote Blutkörperchen, in denen sie sich zu neuen Merozoiten entwickeln, die erneut Blutzellen befallen. Einige entwickeln sich zu männlichen und weiblichen Gamonten, die von der Mücke aufgenommen werden. 4 Gametozyten-Entwicklung und Verschmelzung finden im Mückendarm statt. Die Sporozoiten-Entwicklung erfolgt in Oozysten im Darmepithel. Nach Lyse der Oozysten erreichen einige Sporozoiten die Speicheldrüsen der Mücke. Quelle: Sturm und Heussler (2007)

1.3 Charakterisierung der Leberphase

Plasmodien sind im Zwischenwirt vorwiegend intrazelluläre Parasiten und können somit nur gemeinsam mit ihren Wirtszellen kultiviert werden. Der humanpathogene

1. Einleitung

Erreger *P. falciparum* wurde im Labor zunächst nur im Blutstadium erfolgreich gezüchtet (Trager and Jensen, 1976).

Parasiten der Leberphase sind nicht fähig, nach Beendigung ihrer Entwicklung neue Hepatozyten zu infizieren. Um die Leberphase zu erforschen, ist man daher stets auf infizierte *Anopheles*-Mücken angewiesen, aus denen die Sporozoiten zur Infektion von Hepatozyten gewonnen werden. Im Falle von *P. falciparum* ist die Arbeit mit infizierten *Anopheles*-Mücken nur unter S3-Bedingungen realisierbar und daher sehr aufwendig.

Erst die Etablierung des Nagetiermodells mit *P. berghei* ermöglichte auch die Erforschung der Leberphase im Labor. Hierfür ist die Zucht von *Anopheles*-Mücken notwendig, wobei weibliche Mücken bei einer infektiösen Blutmahlzeit die Parasiten aufnehmen. Mit den nach 14-20 Tagen aus den Speicheldrüsen isolierten Sporozoiten können *in vitro*-Infektionen primärer Hepatozyten (Meis et al., 1984) oder humaner bzw. muriner Hepatomazellen (Hollingdale et al., 1983) durchgeführt werden.

In vivo müssen Sporozoiten den Blutstrom verlassen, um Hepatozyten zu infizieren. Da vermutet wird, dass hierfür die Fähigkeit Zellen zu durchqueren notwendig ist (Ishino et al., 2005a), erfolgt dies höchstwahrscheinlich über die Kupfferzellen, die Makrophagen der Leber (Pradel and Frevert, 2001). Allerdings lassen sich Leberzellen auch in Abwesenheit von Kupfferzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* infizieren. Sicher ist, dass einige Sporozoiten nach dem Durchwandern mehrerer Leberzellen schließlich in einen Hepatozyten eindringen und sich dort entwickeln (Mota and Rodriguez, 2001).

Um eine Leberzelle zu infizieren und sich in ihr zu entwickeln, muss der Parasit vom Zell-Passage-Modus zum Zell-Infektions-Modus umschalten können. Die Proteine p36 und p36p scheinen hier eine wichtige Rolle zu spielen: Parasiten, denen eines dieser Proteine fehlt, zeigen ein gesteigertes Zell-Passage-Verhalten (Ishino et al., 2005b). Das Protein p36p hat darüber hinaus Einfluss auf die Wirtszelle. Plasmodien, welchen dieses Protein fehlt, können nach Leberzell-Infektion die Einleitung der Apoptose durch die Wirtszelle nicht blockieren (van Dijk et al., 2005).

24h nach Infektion der Leberzelle hat der Parasit die frühe Schizontenform erreicht und beginnt mit multiplen Kernteilungen (Tarun et al., 2008). 40h nach Infektion hat er schon bis zu 13 Kernteilungen durchgeführt und dadurch viele tausend Kerne

1. Einleitung

gebildet. 50h nach Infektion beginnt der Parasit damit, Merozoiten zu formen (Tarun et al., 2008).

1.4 Die Leberphase aus immunologischer Sicht

Parasiten, die den größten Teil ihres Lebenszyklus in einer Wirtszelle verbringen, verhindern einen direkten Kontakt mit Zellen des Immunsystems des Wirtes. Die infizierte Zelle ist dem Eindringling jedoch nicht vollkommen schutzlos ausgeliefert. So hat sie zum einen die Möglichkeit, den programmierten Zelltod einzuleiten und damit sich selbst und den Parasiten zu eliminieren. Zum anderen kann sie Proteine des eingedrungenen Parasiten an ihrer Zelloberfläche präsentieren und dadurch T-Lymphozyten auf die intrazelluläre Infektion aufmerksam machen. Letztere reagieren auf die angebotenen Parasitenepitope, wenn diese zusammen mit einem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) detektiert werden. Nahezu alle zellkernhaltigen Zellen exprimieren MHC-I-Moleküle an ihrer Oberfläche. Da die T-Lymphozyten den Oberflächenrezeptor CD8 tragen, spricht man auch von einer CD8-induzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort, die meist in der Zerstörung infizierter Zellen resultiert. Durch das gezielte Ausschalten der CD8-T-Zellen *in vivo* konnte gezeigt werden, dass sie am Aufbau einer sterilen Immunität durch attenuierte Parasiten beteiligt sind (Doolan and Hoffman, 2000).

Rote Blutzellen, die ihren Zellkern verloren haben, bilden keine MHC-I-Komplexe mehr, was wahrscheinlich auch ein Grund dafür ist, dass Plasmodien sich vornehmlich in diesen Zellen vermehren. Rote Blutzellen werden vom Parasiten massiv umgebaut, weshalb auch viele sezernierte Parasitenproteine aus diesem Stadium bekannt sind (Gardner et al., 2002). Hepatozyten sind dagegen fähig, MHC-I-Moleküle zu exprimieren und somit Epitope sezernierter Parasitenproteine zu präsentieren. Auf Grund dieser Eigenschaft sind Leberzellen für die Impfstoffentwicklung wichtig (Doolan and Hoffman, 2000; Todryk and Walther, 2005). In der Impfstoff-Forschung scheint bisher die Verwendung attenuierter Plasmodien als Lebendvakzine die einzige Methode zu sein, welche lang anhaltende Immunität gegenüber Plasmodien vermittelt (Mueller et al., 2005a; Mueller et al., 2007; Mueller et al., 2005b; Nussenzweig et al., 1967; Tarun et al., 2007; van Dijk et al., 2005). Mit radioaktiv bestrahlten Parasiten, die während der Leberphase sterben, lässt sich bei

1. Einleitung

Mäusen ein Impfschutz gegen murine Malariaerreger (Nussenzweig et al., 1967) aufbauen. Durch Injektion so behandelter Sporozoiten wurde eine CD8-T-Zell-Antwort induziert (Mazier et al., 1990; Todryk and Walther, 2005), welche sich *in vivo* durch Inhibierung der T-Zellen mittels entsprechender Antikörper nachweisen ließ (Oliveira-Ferreira and Daniel-Ribeiro, 2001). T-Zellen aus immunen Mäusen zerstören infizierte Leberzellen *in vitro*, was auf eine zytotoxische T-Zell-Antwort auf Sporozoiten- oder Leberphasenproteine hindeutet (Hoffman et al., 1990). Die T-Zellen sezernieren neben Interferon- γ auch Interleukin-12. Dieses Zytokin lockt Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an und induziert bei ihnen wiederum die Produktion von Interferon- γ . Umgekehrt steigert Interferon- γ die Produktion von Interleukin-12, so dass die Konzentration dieser beiden Moleküle in der Umgebung des infizierten Hepatozyten ansteigt. Interferon- γ regt die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in infizierten Hepatozyten an, und die entstehenden Stickstoffmonoxid-Radikale eliminieren den Parasiten (Doolan and Hoffman, 2000).

Eine durch radioaktiv bestrahlte Parasiten hervorgerufene Immunität bleibt auch bei massiven Dosen infektiöser Sporozoiten wirksam (Doolan and Hoffman, 2000). Dagegen schützt eine Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Parasiten-Proteinen, wie dem *circumsporozoite protein* (CS), nur bedingt vor einer Infektion. So können monoklonale sowie polyklonale Antikörper gegen CS-Epitope eine Leberzell-Infektion nur bei Gabe geringer Sporozoitenmengen verhindern (Egan et al., 1987). Diese Antikörper schützen aber nicht, wenn sich Parasiten bereits in den Leberzellen etabliert haben, da sie ausschließlich gegen Sporozoiten gerichtet sind.

Die Präsentation von Parasitenepitopen über MHC-Komplexe aktiviert auch CD4-T-Zellen, die an der Antikörperproduktion beteiligt sind. Ursprünglich wurde angenommen, dass die T-Zell-Reaktionen ausschließlich in Folge einer Antigen-Präsentation der Hepatozyten erfolgen (Doolan and Hoffman, 2000). Die Leber ist jedoch ein immuntolerantes Organ, in dem das Gleichgewicht pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in Richtung anti-inflammatorischer verschoben ist. Die Immuntoleranz ist wichtig, da die Zellen der Leber in Kontakt mit zahlreichen Antigenen (z.B. Lipopolysaccharide von Darmbakterien) kommen, welche von den Darmepithelien aufgenommen und über das Pfortadersystem zur Leber transportiert werden (Everett et al., 2003). Ohne Immuntoleranz würden diese Antigene permanent Entzündungsreaktionen hervorrufen. Am Aufbau der Toleranz erfolgt

1. Einleitung

durch Kupffer- und Endothelzellen sowie verschiedene Lymphozyten, die hauptsächlich an der Expression anti-inflammatorischer Faktoren, wie z.B. Interleukin-10 oder TGF- β (*transforming growth factor*) beteiligt sind (Racanelli and Rehermann, 2006).

Inzwischen wird davon ausgegangen, dass injizierte Sporozoiten nicht nur Hepatozyten befallen, sondern an der Einstichstelle der *Anopheles*-Mücke auch in Hautzellen eindringen. Dort vollzieht der Parasit dann offenbar dieselbe Entwicklung wie in den Leberzellen, kann seine Wirtszelle als Merozoit jedoch nicht verlassen und stirbt (Menard, 2008). Die sich in der Haut befindlichen Zellen induzieren eine starke Immunantwort, da hier, im Gegensatz zur Leber, keine Immunsuppression statt findet (Strid et al., 2006). Auch in Hautzellen werden MHC-I-Antigen-Komplexe gebildet und damit zytotoxische CD8-T-Zellen aktiviert (Stoitzner et al., 2006). Daher erfolgt die Immunreaktion des Wirtes durch eingedrungene Plasmodium-Sporozoiten wahrscheinlich hauptsächlich im Hautgewebe.

Mit radioaktiv bestrahlten Parasiten ließ sich zwar eine Immunität bei Mäusen (Nussenzweig et al., 1967), Affen (Jahiel et al., 1970) und auch beim Menschen (Clyde et al., 1973a; Clyde et al., 1973b) erzeugen, jedoch ist diese Impfstrategie für weite Teile Afrikas und Asiens nicht einsetzbar, da in diesen Ländern die entsprechende Infrastruktur fehlt. Deshalb wurde angestrebt, die Parasiten genetisch zu verändern und damit zu schwächen. Die Ansätze beruhen zunächst auf dem *knock-out* von Genen, die in Sporozoiten und in der frühen Leberphase exprimiert werden. Einzelgen-*knock-outs*, wie am Beispiel des *uis-3* (*upregulated in sporozoites*) (Mueller et al., 2005b), des *uis-4* (Mueller et al., 2005a), des *p36p* (van Dijk et al., 2005) oder Doppelgen-*knock-outs* *uis-3* und *uis-4* betreffend (Mueller et al., 2007; Tarun et al., 2007) demonstriert wurde, führen in Laborversuchen an Mäusen zu einer sterilen Immunität.

Bisherige genetische Attenuierungsversuche konnten sich nur auf Sporozoitengene beziehen, da Gene, die nur während der Leberphase transkribiert werden, unbekannt waren. Deshalb ist diese Immunantwort lediglich gegen Sporozoiten und frühe Leberphasenparasiten gerichtet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Protein identifiziert werden, das nur in der Leberphase exprimiert und zusätzlich vom Parasiten sezerniert wird, denn es wird vermutet, dass solche sezernierten Proteine Einfluss auf die Wirtszelle nehmen

1. Einleitung

können. Die Hemmung der Expression derartiger Proteine würde idealerweise den Zelltod der Wirtszelle auslösen. Das Absterben der infizierten Zelle hätte zum einen den Vorteil, den intrazellulären Parasiten eliminieren zu können. Zum anderen würden Zelltrümmer von Antigen-Präsentierenden-Zellen (APC) phagozytiert und schließlich auch über MHC-Komplexe präsentiert (Stoitzner et al., 2006). Dieser als *cross-presentation* (CP) oder *cross-presenting-pathway* (CPP) bezeichnete Prozess beschreibt die Antigen-Präsentation einer selbst nicht infizierten Zelle und die damit verbundene Aktivierung von CD8- und CD4-T-Zellen (Racanelli and Rehermann, 2006). In der Leber besitzen z.B. die Kupffer-Zellen (Racanelli and Rehermann, 2006) und in der Haut die Langerhans-Zellen (Stoitzner et al., 2006) diese Fähigkeit. Es wäre vor allem für diese Art der Antigen-Präsentation wichtig, dass viele Parasitenproteine vorliegen und auf diese Weise von mehreren APCs genutzt werden können.

1.5 Der programmierte Zelltod

Die Selbstzerstörung der Zelle ist neben der beschriebenen Aktivierung des Immunsystems eine zusätzliche Möglichkeit des Wirtes, gegen den intrazellulären Parasiten vorzugehen. Jedoch verfügen nahezu alle Parasiten, die dem Phylum Apikomplexa angehören (z.B. *Toxoplasma gondii* (Goebel et al., 1998), *Theileria sp.* (Heussler et al., 1999) und *P. berghei* (van de Sand et al., 2005)), über Strategien, die eine Apoptose der Wirtszelle verhindern können.

Bevor sich Plasmodium-Sporozoit in einer Leberzelle zu Leberschizonten entwickeln, durchqueren sie mehrere Hepatozyten und setzen in den verwundeten Zellen HGF (*hepatocyte growth factor*) frei (Mota et al., 2002; Carrolo et al., 2003). Dieses Molekül kann cMET-Rezeptoren der Wirtszelle stimulieren und so eine Einleitung der Apoptose nach Parasiteninvasion verhindern (Leiriao et al., 2005). Die Notwendigkeit der HGF-Freisetzung ist jedoch umstritten: Parasiten, deren Protein Spect1 (*sporozoite microneme protein essential for cell traversal*) oder Spect2 ausgeschaltet ist, können keine Leberzellen durchwandern, sie aber sehr erfolgreich infizieren (Ishino et al., 2004). Der Wachstumsfaktor HGF kann also keine bedeutende Rolle spielen. Er zeigt zwar eine inhibierende Wirkung bezüglich Apoptose in Hepatozyten (Carrolo et al., 2003; Huh et al., 2004), doch wäre dieser

1. Einleitung

Effekt auf die frühe Leberphase des Parasiten beschränkt. Wild-Typ (WT)-Parasiten können die Wirtszellapoptose jedoch bis in die späte Leberphase hinein verhindern (van de Sand et al., 2005). Erst gegen Ende der Leberphase wird ein nicht-apoptotischer Zelltod eingeleitet, in welchen Cystein-Proteasen involviert sind. Diese unterscheiden sich jedoch von Apoptose-typischen Caspasen (Sturm and Heussler, 2007). Möglicherweise spielen Parasiten-Proteasen der SERA-Familie bei diesem Prozess eine entscheidende Rolle (Schmidt-Christensen et al., 2008). Diese Proteine liegen am Ende der Leberphase vollständig prozessiert im Zytosol der Wirtszelle vor und sind im Zusammenhang mit der Parasiten-Freisetzung bereits aus anderen Stadien bekannt (Aly and Matuschewski, 2005; Miller et al., 2002).

Es wird vermutet, dass der Parasit direkt in die Signaltransduktion der Wirtszelle eingreift. Er hat dabei zum einen die Möglichkeit, die Bildung anti-apoptotischer Proteine zu steigern oder aber die Synthese pro-apoptotischer Proteine zu hemmen. In jedem Fall muss er mit der Wirtszelle kommunizieren. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass Parasitenproteine ins Wirtszellzytosol gelangen.

Stefanie Bolte wies in ihrer Dissertation (2006) eine Tyrosin-Phosphorylierung an der parasitophoren Vakuolenmembran von Plasmodien nach, welche HepG2-Zellen infiziert hatten, was auf eine Signaltransduktion hinweist. Die parasitophore Vakuolenmembran scheint also eine Schaltstelle zwischen Parasit und Wirtszelle zu sein. Proteine, die in die parasitophore Vakuole selbst, ihre Membran oder in das Wirtszellzytosol transportiert werden, verfügen in der Regel über ein Signalpeptid. Die Existenz einer solchen Struktur weist demnach schon vor der näheren Untersuchung eines Proteins auf eine mögliche Sezernierung hin.

1.6 Proteinexport

In den intrazellulären Stadien ist *Plasmodium* von einer parasitophoren Vakuole (PV) umgeben (Gunther et al., 1991). Diese entsteht, wenn der Parasit in eine Zelle eindringt (Ragge et al., 1990). Ein Protein, welches in das Lumen oder in die Membran dieser Vakuole gelangen soll, wird in Vesikeln zur Plasmamembran der Parasitenzelle transportiert. Bei der Verschmelzung des Vesikels mit der Membran wird dann das Protein in das Lumen der parasitophoren Vakuole abgegeben. Für diesen Transportweg ist ein Signalpeptid notwendig (Rug et al., 2004). Es besteht

1. Einleitung

aus 20-30 meist hydrophoben Aminosäuren, die N-terminal am jeweiligen Protein liegen und leitet das Protein zum endoplasmatischen Retikulum. Hier wird das Signalpeptid abgespalten und das restliche Protein in Vesikeln verpackt weitertransportiert.

Ein Proteintransport vom Parasiten in die Wirtszelle ist in erster Linie aus dem Blutstadium von *P. falciparum* bekannt. Über 100 *rifin-* (*repetitive interspersed family*), 30 *stevor-* (*sub-telomeric variable open reading frame*) und ca. 60 *var* (*variable gene family*) -Gene sowie verschiedene einzelne Gene kodieren für exportierte Blutstadienproteine (Templeton and Deitsch, 2005). Zu diesen zählt auch das KAHR-Protein (*knob-associated-histidine-rich-protein*), welches im Trophozoiten-Stadium die Blutzelle so modifiziert, dass sie Ausbuchtungen an ihrer Plasmamembran bildet (Marti et al., 2005). Damit bleiben die infizierten Blutzellen an der Kapillarwand haften und entgehen so der Vernichtung in der Milz. All diese Proteine besitzen ein spezielles Motiv innerhalb der ersten 100 Aminosäuren, die Sequenzfolge RxLxQ/E (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004). Sie ist für den Protein-Export in die Wirtszelle verantwortlich, weshalb sie als Pexel (*protein-export-element*) (Marti et al., 2004) oder als VTS (*vacuolar-transport-signal*) (Hiller et al., 2004) beschrieben wird. Letztere Bezeichnung bezieht sich auf die Tatsache, dass damit der Transport durch die parasitophore Vakuole gesteuert wird.

Viele der genannten Proteine besitzen neben dem Pexel/VTS-Motiv auch ein Signalpeptid. Für die Identifikation eines sezernierten Proteins sind folglich derartige Motive zu berücksichtigen.

1.7 Listeriolysin O (LLO)

In der vorliegenden Arbeit wird nach Proteinen gesucht, deren Expression auf die Leberphase beschränkt ist. Der Promotorbereich eines Gens, das nur während des Leberstadiums exprimiert wird, kann dafür genutzt werden, ein für Plasmodien toxisches Protein zu exprimieren. Damit könnte der Parasit gezielt während der Leberphase attenuiert werden, was neben der Erzeugung radioaktiv bestrahlter oder durch Gen-*knock-out* geschwächter Parasiten eine weitere Strategie zur Herstellung einer Lebendvakzine sein könnte.

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Listeriolysin O (LLO) auf *P. berghei* untersucht. Es wird von dem Gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes* exprimiert und gehört zur Proteinfamilie der Cholesterol-abhängigen Zytolysine (CDC = *cholesterol-dependent cytolysins*). Sie gehören mit über 20 Mitgliedern zur größten Familie der Poren-formenden Proteine.

Listeriolysin O ist ein pH-abhängiges Zytolysin (siehe Abb.1.2), das bei saurem pH-Wert aktiv ist und somit den Bakterien nach Phagozytose durch Makrophagen, Endothelzellen oder Hepatozyten (Vazquez-Boland et al., 2001) das Entkommen aus den sauren Phagosomen ermöglicht (Edelson and Unanue, 2001). Im pH-neutralen Wirtszellzytosol ist LLO inaktiv, so dass die Wirtszelle vor dem Protein geschützt ist und sich die Bakterien im Zytosol vermehren können (Glomski et al., 2002; Schnupf and Portnoy, 2007; Schuerch et al., 2005). Listeriolysin wird in Form von Monomeren sezerniert, die sich zu großen Poren-Komplexen zusammenschließen. Dazu akkumulieren die Monomere an Cholesterol-reichen Stellen der Ziellmembran.

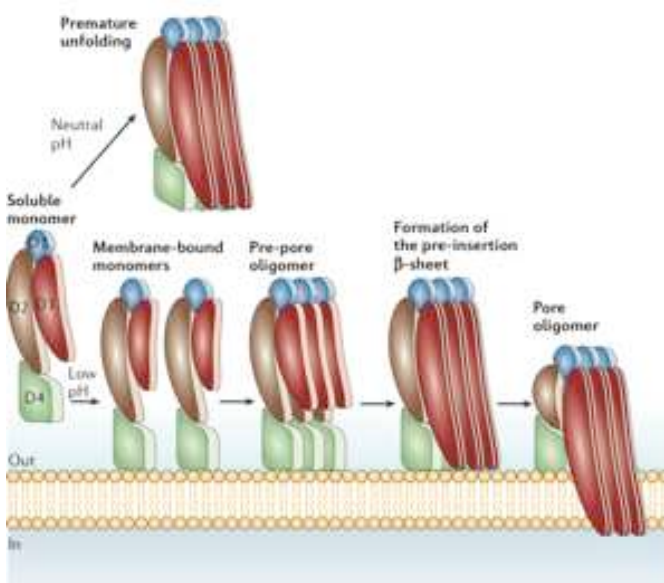


Abb.1.2: Mechanismus der Porenbildung durch Listeriolysin O. Bei niedrigem pH-Wert interagieren die löslichen LLO-Monomere über die Domäne 4 (D4) mit Cholesterol-Molekülen in der Ziellmembran. Strukturänderungen im Monomer ermöglichen Wasserstoffbrücken-Bindungen zu weiteren LLO-Monomeren, so dass schließlich Oligomere vorliegen. Durch die Konformationsänderung bestimmter α -Helices in Domäne 3 (D3) entstehen transmembrane β -Haarnadel-Schleifen. Oligomere lagern sich kreisförmig zusammen und bilden eine Pore mit einem Durchmesser von ca. 250-300 Å. Bei neutralem pH-Wert findet die Konformationsänderung in D3 verfrüht statt und verhindert so die Anlagerung von LLO und damit die Porenbildung.

Quelle: (Hamon et al., 2006)

Durch den Einsatz eines mutierten LLO, welches auch bei neutralem pH-Wert aktiv ist, wird die Wirtszelle durch Perforation der Zellmembran zerstört. Die Mutation beruht auf dem Austausch einer einzigen Aminosäure (L461T) in Domäne 4 des LLO-Moleküls (Glomski et al., 2002).

Da bei Plasmodien Cholesterol speziell während der Leberphase in der PVM angereichert ist (Bano et al., 2007), wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit mit einer hohen toxischen Wirkung des LLO gerechnet.

1. Einleitung

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit sollten Proteine des Parasiten *P. berghei* identifiziert und charakterisiert werden, die nur während der Leberphase exprimiert und sezerniert werden. Solche Proteine könnten bei der Kommunikation von Parasit und Wirtszelle eine wichtige Rolle spielen. Die Hemmung der Expression sezernierter Proteine durch genetische Manipulation kann außerdem zur Attenuierung des Parasiten führen und die Grundlage zur Herstellung einer Lebendvakzine sein.

Um sezernierte Proteine in infizierten Hepatozyten lokalisieren zu können, sollten sie als GFP-Fusionsproteine in *P. berghei* exprimiert werden. Dazu müssen *P. berghei*-Schizontenkulturen hergestellt und mit den entsprechenden Plasmidkonstrukten transfiziert werden.

Außerdem sollten Antikörper gegen die identifizierten Proteine produziert werden. Hierzu sind zunächst Plasmidkonstrukte für die Expression von Fusionsproteinen in Bakterien herzustellen. Die aufgereinigten Fusionsproteine sollten dann für die Immunisierung von Mäusen eingesetzt und mit den entsprechenden Hyperimmunseren *P. berghei*-infizierte Hepatozyten angefärbt werden.

Um mehr über die Funktion der identifizierten Proteine zu erfahren, sollten genetisch veränderte Parasiten erzeugt werden, die kein funktionsfähiges Protein exprimieren können. Falls diese Parasiten ihre Entwicklung in Hepatozyten nicht abschließen können, sollten sie außerdem als Lebendvakzine evaluiert werden.

Schließlich sollte ein Promotor eines Leberstadien-spezifisch exprimierten Gens näher charakterisiert und für die Expression plasmodizider Proteine in Parasiten eingesetzt werden. Ziel war es wiederum, genetisch attenuierte Parasiten herzustellen, die als Lebendvakzine eingesetzt werden könnten.

2. Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

ART	NAME	HERSTELLER
Acrylamidgelkammer	Hoefer Mighty Small II	Amersham Pharmacia Biotech
Acrylamidgelkammer	Mini PREP-Cell	Bio-Rad
Agarosegelkammer	Horizon® 58	Gibco BRL
<i>Blotting</i> -Apparatur	Modell EB10	Labtech International
Brutschrank	B 6200	Heraeus
Elektroporator	Nucleofector	Amaxa
Fluoreszenz-Mikroskop	Axioskop 2 plus	Zeiss
Fluoreszenz-Mikroskop	Leitz DM RB	Leica
Digitalkamera	DFC 350 FX	Leica
Digitalkamera	C4742-95	Hamamatsu
Laborroller	RM5	Assistent
Magnetrührer	RET basic	IKA Labortechnik
PCR-Automat	Thermocycler	Perklin Elmer
pH-Meter	pH Level 1	InoLab
Photometer	Bio-Photometer	Eppendorf
<i>Power Supply</i>	E 835 EPS 3500	Consort Pharmacia Biotech
Schüttler	Certomat®S Innova™ 4400 Unimax 2010 KS250 basic	B.Braun New Brunswick Scientific Heidolph IKA Labortechnik
Sonifikatoren	Sonifer 250 Cell Disruptor B15	Branson Branson
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf

2. Material & Methoden

UV-Transilluminator	UV-Flächenstrahler	Konrad Benda
Kamera	2T1	Raiser
<i>Vortexer</i>	VF2	IKA Labortechnik
Waage	GM-300P	Lutron
Wasserbad	M3	Lauda
Zentrifugen	L8-M Ultrazentrifuge Centrifuge 5415C 1-15K 4K10	Beckmann Eppendorf Sigma Sigma

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

NAME	HERSTELLER
Deckgläschen	Nunc
Einwegkanülen	Braun
Einwegspritzen	Braun
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
Falcon Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson
Glasobjektträger	Roth
Insulin-Einwegspritzen	Becton Dickinson
Kryo-Tubes	Nunc
Kunststoffpipetten	Greiner
Kunststoffpetrischalen	Nunc
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
Pipettenspitzen	Greiner, Sarstedt
Pipetten	Gilson
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell
<i>well</i> -Platten (6,24)	Nunc
Zellkulturflaschen	Nunc

2. Material & Methoden

2.1.3 Chemikalien

NAME	HERSTELLER
2-Mercaptoethanol	Roth
Acrylamid (30%ig)	Biomol
Agarose	Gibco BRL
Ampicillin	Sigma
Ammoniumpersulfat	Biomol
<i>Alseviere Solution</i>	Invitrogen
Borsäure	Merck
Braunswasser (RNase- und DNase-frei)	Braun
Bromphenolblau-Natriumsalz	Merck
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Roth
<i>Coomassie Brilliant Blue R 250</i>	Sigma
<i>Daco Mounting Medium</i>	Daco
DAPI	Roth
DTT	Biomol
EDTA Natriumsalz	Biomol
Essigsäure (100%ig)	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Biomol
Formaldehyd	Merck
Freund`s Adjuvant complete	Sigma
Freund`s Adjuvant incomplete	Sigma
Glucose	Roth
Glycerol	Roth
Gentamycin	Ratiopharm
IPTG	Biomol
Isopropanol	Roth
LB-Agar	Gibco BRL
<i>LB Broth Base</i>	Gibco BRL
Kalziumchlorid	Roth
Kalzium-Natrium-EDTA	Sigma

2. Material & Methoden

Methanol	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Milchpulver	Sucofin
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Merck
Nycodenz®	Axis-Shield
Paraformaldehyd	Roth
Phenylhydrazin-HCl	Sigma
Pyrimethamin	Sigma
RNAse-freies Wasser	Quiagen
RPMI 1640 (25mM HEPES, L-Glutamin)	PAA
SDS	Biomol
SOC-Medium	Gibco BRL
TEMED	Biomol
Tris-HCl	Biomol
Trizol	Sigma
Tween 20	Merck
X-Gal	Biomol

2.1.4 Restriktionsendonukleasen

NAME	HERSTELLER
<i>BamHI</i>	New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs
<i>NheI</i>	New England Biolabs
<i>SpeI</i>	New England Biolabs
<i>XbaI</i>	New England Biolabs
<i>XhoI</i>	New England Biolabs

2.1.5 Spezielle Enzyme

NAME	HERSTELLER
DNase	Gibco BRL
Lysozym	Sigma

2. Material & Methoden

PHUSION-HF Polymerase	Finnzymes / NEB
Superscript RT II	Invitrogen
Mid-Range Polymerase	Peqlab
T4-DNA-Ligase	Promega
Trypsin	PAA

2.1.6 Antikörper

NAME	HERSTELLER
Anti- <i>mouse</i> Alexa 594	Molecular Probes
Anti- <i>mouse</i> Alexa 488	Molecular Probes
Anti- <i>mouse</i> HRP-labeled	Pierce
Anti- <i>chicken</i> Alexa 488	Molecular Probes
Anti- <i>chicken</i> Alexa 594	Molecular Probes
Anti- <i>rabbit</i> Cy2	Dianova
Anti-Fluorescein	Roche
Anti-GFP (<i>rabbit</i>)	Molecular Probes
Anti-PbExp1 (<i>chicken</i>)	BNI AG Heussler
Anti-PbLSA4 (<i>mouse</i>)	BNI AG Heussler
Anti-LLO (<i>mouse</i>)	Royal Holloway and Bedford New College, London

2.1.7 Plasmide

NAME	HERSTELLER
pGem-T-Easy	Promega
pGex6P1	Amersham Pharmacia Biotech
pL0017	MR4 www.malaria.mr4.org
pL0031	MR4 www.malaria.mr4.org
pJC45	BNI-Hamburg
pJH326	Royal Holloway and Bedford New College, London

2. Material & Methoden

2.1.8 Oligonukleotide

NAME	NUMMER	SEQUENZ
PbTubulinfor	66	TGGAGCAGGAAATAACTGGG
PbTubulinrev	67	ACCTGACATAGCGGCTGAAA
Pb001090.02.0for	347	TTTTGGGGCTATCTAGCTATTTT
Pb001090.02.0rev	348	AGTTATAACAGTTAACACATTGTTTCG
Pb000905.02.0for	349	ACCGAAAAACATTTCCCTTTG
Pb000905.02.0rev	350	TGGTGCAACTTGACTTGGA
Pb001109.00.0for	351	ATGAGAGCGCCTCCAAAA
Pb001109.00.0rev	352	ATTCTTCGGGCAATTCTTGA
Pb106206.00.0for	353	CACACAATGAAAATCGATGC
Pb106206.00.0for	354	CCATGGCAATTTTTGCTTTT
Pb000603.02.0for	355	GGAAAATTCAAGACCCATGAAA
Pb000603.02.0rev	356	GAAATCTTGTGTCAAAGCTGCTA
PbLSA4_533_For	508	CGGAATTC AAGATGAGTAAATTTATATTGAGCAACG
PbLSA4_533_Rev	507	CGGGATCCTCTTCTCCTTGAACAGATTTTTTGA
d-ssu-rrna-260-Genom	652	ATACTGTATAACAGGTAAGCTGTTATTGTG
d-ssu-rrna-270-Genom	653	GTGTAGTAACATCAGTTATTGTGTGTG
d-ssu-rrna-635-Plasmid	654	TTTCCCAGTCACGACGTTG
Pb103464-XhO-Rev	572	CCGCTCGAGTCTTCTCCTTGAACAGATTTTTTGA
Pb103464-BamH1-For	573	GCGGATCCAACAGCAATATATCGTCCACCAAG
Pb101911-XhO-Rev	574	CCGCTCGAGTCTCTAGTTGGTGTTCGCTTG
Pb101911-BamH1-For	575	GCGGATCCCATCGTTCTTCCCTCCCTCTG
PromPb103464-Nhe1-A	599	CGGCTAGCGTTGCATTATCGTCAAAAGTG
PromPb103464-BamH1-A	601	CGGGATCCATGTGTAAGTAAAGTAAATGATTATAATAG AAGTG
Pb103464ATG-BamH1	614	CGGGATCCATGAAAGATCATATAAAAAATGTATGC
Pb103464noTAA-BamH1	615	CGGGATCCATCTGTACTTAAAACATAAATTTTCATG
SPEXP1-BamH1-For	701	CGGGATCCATGAAAATCAATATAGCTTCAATTCTT
SPEXP1-BamH1-Rev	702	CGGGATCCATAAGCATTGTTAACAAGG
HlyA-BamH1-For	703	CGGGATCCGATGCATCTGCATTCCATAAA
HlyA-Xba1-Rev	704	GCTCTAGATTATTCGATTGGATTATCTACACTATTAC
PbLSA4KO2-For_Xba1	708	GCTCTAGAATGGTGAAAAAGGTAAACATAAATGTT
PbLSA4KO2-Rev_BamH1	709	CGGGATCCATACTTTTTATCCTTAGATAAATTATACGC
Rev_phos_PrLSA4	725	(Phos) CCTTGATCCTTTATGTTGTGTTTTT
Seq_Primer_PrLSA4	726	TGCATGTATATTCCTCCCTGCAT
MutaKO_LSA4_For	727	AGTAACCCCTTGAGGATATTGACGCAAATGGAATAC AATTAAAGGTTTTCTTTTTGAACTAGTTGAT
MutaKO_LSA4_Rev	728	ATCAACTAGTTCAAAAAGAAAACCTTTAATTGTATTTC CATTGCGTCAATATCCTCAAGGGGTTACT
MRA_GFP-Reverse	792	TCTCGCAAAGCATTGAACAC
PbLSA_D_For	835	CCCTAATAAATGAATGCAGTTGAAATCGAACAAATCC
PbLSA_D_Rev	836	AGGGCAGATTGTGTGGACAGGTAATGTTG

2. Material & Methoden

PbLSA_E_For	837	TAAATGAATGCAGTTGAAATCGAACAAATCC
PbLSA_E_Rev	838	CCGAAAGTAGTGACAAGTGTGGCCAAG
PrLSA4_cut1-NHE1	880	CTAGCTAGCTCGGAGTAATATTCTTCTTCTTCA
PrLSA4_cut2-NHE1	881	CTAGCTAGCTGCATGTATATTCCCCTGCAT
PrLSA4_cut3-NHE1	882	CTAGCTAGCCGATAAAGCGTGCAAACAAA
PrLSA4_cut4-NHE1	883	CTAGCTAGCGCTTCCGTATCGATTTAACCA
PrLSA4_cut5-NHE1	884	CTAGCTAGCCTTCATTGTCAAATTCCTTAGGC

2.1.9 DNA/RNA-Aufreinigungssets

NAME	HERSTELLER
Nucleobond AX 100	Macherey & Nagel
Nucleospin Plasmid	Macherey & Nagel
Nucleospin Extract 2	Macherey & Nagel
RNA Extract 2	Macherey & Nagel
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen

2.1.10 DNA-Marker & Protein-Marker

NAME	HERSTELLER
Hyperladder I™	Bioline
Hyperladder IV™	Bioline
Protein-Marker Broad Range, prestained	New England Biolabs
Protein-Marker Broad Range, unstained	Biorad

2.1.11 Zellen und Organismen

NAME	HERSTELLER
<i>E. coli</i> XL-Gold / XL1-Blue	BNI AG Heussler
<i>E. coli</i> BL21	BNI AG Heussler
<i>Mus musculus</i> NMR1	BNI / Charles River
<i>Mus musculus</i> BalbC	BNI / Charles River
<i>Homo sapiens sapiens</i> HepG2	BNI
<i>Plasmodium berghei</i>	BNI

2. Material & Methoden

2.1.12 Puffer und Nährmedien

NAME	BESTANDTEILE
Earls Mem Nährlösung	500ml Earls Mem 10% FCS 1% Penicillinlösung 1% Aminosäuremischung
2x Lämmli-Puffer	250mM Tris (pH 6,8) 2% SDS 20% Glycerol 2% Mercaptoethanol ~0,01% Bromphenolblau
Laufpuffer für SDS-PAGE (10fach Stocklösung)	10g SDS 30,3g Tris 144,1g Glycin ad 1000ml mit dest. H ₂ O
Komplettmedium zur Transfektion	100ml RPMI1640 (mit 25nM HEPES und L-Gluthamin) 2,5ml Gentamycin (10mg/ml) 25ml FBS
Gepuffertes Medium für den Nycodenz®-Gradienten	5mM Tris/HCl 3mM KCl 0,3mM CaNa ₂ EDTA pH 7,5
PBS (10fach Stocklösung)	100nM Na ₂ HPO ₄ 100nM NaH ₂ PO ₄ 1,5M NaCl pH 7,4
Puffer A	300mM NaCl 100mM Tris/HCl pH 9,5
STET-Puffer	8% Sucrose (Saccharose) 5% Triton-X-100 50mM Na-EDTA 50mM Tris-HCl

2. Material & Methoden

	pH 8,0
New Wash Puffer	50% EtOH 50mM NaCl 5mM Na ₂ EDTA 5mM TrisHCl pH 7,5
SOC-Medium	2% Tryptone 0,5% Hefeextrakt 10mM NaCl 2,5mM KCl, steril 20mM MgCl ₂ , steril 20mM Glucose, steril
SSC-Puffer	0,3M Na ₃ Zitrat 3M NaCl
TAE-Puffer	5mM Natriumacetat x 3H ₂ O 40mM Tris 2mM Na ₂ EDTA pH 7,9
TBE-Puffer (10fach Stocklösung)	108g Tris 55g Borsäure 9,3g EDTA ad 1000ml mit dest. H ₂ O
TBS	50mM Tris 150mM NaCl pH 7,5
TBS-Tween	50mM Tris 150mM NaCl 0,05% Tween20 pH 7,5
2xTSS	20% PEG 6000 10% DMSO 100mM MgCl ₂ in LB pH 6,5 steril filtriert

2. Material & Methoden

Transfer-Puffer	192mM Glycin 25mM Tris 1,3mM SDS 20% Methanol pH 8,3
Einfriermedium	9ml Alseviere-Solution 1ml Glycerol

2.1.13 Sonstiges

Spirulina Fischfutter	TetraMin
Ketavet®	Bayer AG
Domitor®	Pfizer AG
Antisedan®	Pfizer AG
Kollagen	PAA

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *P. berghei*

Um die kontinuierliche Entwicklung des Parasiten zu gewährleisten, wurden NMRI-Mäuse und Moskitos der Gattung *Anopheles* als Wirtstiere der unterschiedlichen Stadien eingesetzt.

Die Mücken wurden in temperierten Kammern bei 27°C und einer Luftfeuchtigkeit von 80% sowie einem 12-Stunden-Tag-und-Nacht-Zyklus gezüchtet. Bis zu 500 adulte Tiere wurden in 30x30x30cm großen Käfigen gehalten. Ein mit 10%iger Glucoselösung getränkter Watteball diente als Nahrung. Zusätzlich wurde den weiblichen Moskitos ein bis zwei Mal pro Woche eine Blutmahlzeit ermöglicht. Dazu wurde humanes Spenderblut 1:1 mit FCS gemischt und in einen Metallzylinder gegeben, der zu einer Seite offen war. Über die geöffnete Seite wurde Parafilm gespannt und der Zylinder so auf den Mückenkäfig gestellt, dass die Tiere den Parafilm durchstechen und das Blutgemisch trinken konnten. Der Metallzylinder wurde während der Blutmahlzeit auf 37°C erwärmt. Zwei Tage nach der

2. Material & Methoden

Blutaufnahme wurde eine feuchte Filterscheibe in den Käfig gelegt, auf welchem die Weibchen dann ihre Eier ablegten. Anschließend wurde die Filterscheibe in eine mit Wasser gefüllte Schale gegeben. Die Larven wurden nach dem Schlüpfen mit Spirulina-Fischfutter versorgt. Nach etwa 10 Tagen wurden die Puppenstadien von den Larven getrennt, in einer kleineren Wasserschale gesammelt und in einen Zuchtkäfig gestellt, wo die adulten Tiere schlüpften.

Um die Weibchen mit *P. berghei* zu infizieren, wurden jeweils 150 weibliche Moskitos in Infektionskäfige überführt. Die Maus, die für die nun folgende Blutmahlzeit eingesetzt wurde, war zunächst mit 6mg/ml Phenylhydrazin (gelöst in PBS, pH 7,2) behandelt und zwei Tage später mit *P. berghei* infiziert worden. Tägliche Untersuchungen des Mausblutes zeigten einerseits den Grad der Infektion an und andererseits, ob bereits Gametozyten vorhanden waren. Konnten Gametozyten identifiziert werden, wurden mit dieser Maus meist noch am selben Tag die Mücken infiziert. Zur Betäubung wurden der Maus Ketamin (Ketavet®) und Domitor® intra-peritoneal appliziert. Die Dosierung wurde jeweils dem Körpergewicht der Maus entsprechend gewählt: Bei einem Gewicht von z.B. 25g wurden 12mg/ml Ketamin (Ketavet®) und 1,6mg/ml Domitor® pro ml in PBS injiziert. Nach sorgfältiger Überprüfung der Anästhesie wurde das Tier für 20min auf den Mückenkäfig gelegt und danach durch intramuskuläre Injektion von 50%iger Antisedan®-Lösung geweckt. Während der Narkose wurden die Augen der Mäuse mit Bepanthen-Augensalbe behandelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Des weiteren wurde den jeweiligen Mäusen 1ml 0,9%ige isotonische Kochsalzlösung subkutan injiziert, um den durch die Blutmahlzeit entstehenden Flüssigkeitsverlust auszugleichen. Mit der beschriebenen Methode wurden sowohl Mücken (ausgehend von einer infizierten Maus) als auch Mäuse (ausgehend von infizierten Mücken) infiziert.

2.2.2 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinie HepG2

Humane HepG2-Hepatomazellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 12,5 bis 175cm² in komplettem Earls Mem Flüssigmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Diese Zellen bilden zunächst einen *monolayer* am Gefäßboden. War der Boden zu ca. 80% bedeckt, wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und damit vom Untergrund abgelöst. Mit den frei im Nährmedium schwimmenden Zellen wurden wiederum Zellkulturflaschen angeimpft.

2. Material & Methoden

2.2.2.1 Subkultivierung von HepG2-Zellen in 24-well-Platten

Die Karzinomazelllinie wurde für Infektionen mit *P. berghei* auf Deckgläschen in 24-well-Platten in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/well ausgesät. Zuvor wurden die Deckgläschen mit einer 7,5%igen Kollagen-PBS-Lösung behandelt. Nach Überschichtung der Deckgläschen ließ man das Kollagen entweder 4h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C auf den Deckgläschen. Danach wurde die übrige Kollagen-Lösung verworfen und die nun beschichteten Deckgläschen verwendet. Die HepG2-Zellen wurden nach dem Aussäen über Nacht stehen gelassen. Nach deren Anwachsen auf dem beschichteten Deckgläschen wurde das Nährmedium, in dem die Zellen gelöst waren, verworfen und durch frisches, zellfreies Medium ersetzt.

Infektion von HepG2-Zellen mit *P. berghei*-Sporozoit

In *A. stephensi*-Mücken, die bei einer infektiösen Blutmahlzeit männliche und weibliche *P. berghei*-Gamonten aufgenommen haben, entwickeln sich im Laufe von 14-21 Tagen Sporozoit, die in die Speicheldrüsen der Mücke einwandern. Zur Sporozoitentwicklung wurden die infizierten Mücken bei einer Luftfeuchtigkeit von 80% und einer Temperatur von 21°C gehalten.

Zur Isolierung der Parasiten wurden die Mücken zunächst mit Chloroform betäubt und durch Entfernung von Flügelpaar und Beinen immobilisiert. Unter dem Binokular wurden die Speicheldrüsen durch vorsichtiges Auseinanderziehen von Kopf und Thorax freigelegt. In einem Tropfen Nährmedium wurden die gewonnenen Speicheldrüsen mechanisch zerstört. Die daraus hervorquellenden Sporozoit wurden mit Hilfe einer Pipette auf das mit HepG2-Zellen bewachsene Deckgläschen gegeben. Nach 4-6h wurde schließlich ein Mediumwechsel mit frischem Earls Mem durchgeführt.

2.2.3 Fixierung und Färbung von HepG2-Zellen

Die Fixierung erfolgte je nach Versuchsplanung 16, 25, 30, 48 oder 60h nach Infektion.

2.2.3.1 Fixierung infizierter HepG2-Zellen

Zunächst wurde das Nährmedium von dem bewachsenen Deckgläschen entfernt. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 4% PFA in PBS fixiert. Nach zwanzigminütiger Inkubation wurde die PFA-

2. Material & Methoden

Lösung entfernt und die Zellen mindestens 3x5min mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte entweder durch Zugabe von 100%igem Methanol bei -20°C oder durch eine 0,2%ige Triton-X-100/PBS-Lösung. Durch dreimaliges Waschen wurden die Detergenzien nach 15min wieder entfernt.

2.2.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung infizierter HepG2-Zellen

Um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren, wurde der fixierte Zellrasen mit 10%igem FCS in PBS für 30min bei RT gesättigt. Nach Entfernung des FCS wurden die primären Antikörper ohne weiteren Waschschrift auf die HepG2-Zellen gegeben. Die Antikörper wurden zuvor in 1,5%igem FCS/PBS verdünnt. Die Zellen wurden nun im Dunkeln bei RT für mindestens 1h inkubiert und anschließend dreimal 5min mit PBS gewaschen. Danach wurden die behandelten Deckgläschen mit den Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern behandelt. Diese wurden ebenfalls in 1,5%igem FCS/PBS verdünnt. Zusätzlich wurde der DNA-Farbstoff DAPI (100µg/ml) zu der Lösung gegeben. Hiermit wurden die HepG2-Zellen ebenfalls mindestens 1h inkubiert. Die Lösung wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS (5min) entfernt. Während des letzten Waschschriftes wurden die Objektträger mit einem Tropfen *DACO-Mounting-Medium* vorbereitet. Die gefärbten Deckgläschen wurden abschließend mit der bewachsenen Zellseite auf den Objektträger gelegt und bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop bei +4°C gelagert.

HepG2-Zellen, die lebend betrachtet werden sollten, wurden nach dreimaligem Waschen entweder zusammen mit einem PBS-Tropfen auf einem Objektträger oder in der 24-*well*-Platte direkt untersucht.

2.2.4 RNA-Isolation verschiedener *P. berghei*-Entwicklungsphasen

Für die RNA-Gewinnung wurde ausschließlich das *RNA-Extract-II-Kit* von Macherey & Nagel verwendet. Es enthält den Lysepuffer R1, in welchem die jeweiligen Zellen chemisch aufgeschlossen werden. Zusätzlich enthält dieser Puffer Reagenzien, die die Funktion von RNAsen inhibieren.

2. Material & Methoden

Bei den einzelnen Reinigungsschritten wurde sich an das beigefügte Protokoll gehalten und die gereinigte RNA in RNA-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Mückenphase

Um RNA aus diesem Entwicklungsstadium zu gewinnen, wurden 20 infizierte Mitteldärme aus den Mücken entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt, das R1-Lysepuffer enthielt. Durch intensives Schütteln lösten sich die Mitteldärme und die daran haftenden Oozysten komplett auf und konnten sofort auf die dem *Kit* beiliegende RNA-Säule gegeben werden.

Leberphase

Infizierte HepG2-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten noch innerhalb der 24-*well*-Platten (siehe 2.2.3) mit R1-Puffer überschichtet und lysiert. Das gewonnene Lysat wurde direkt auf die RNA-Säule gegeben.

Blutphase

Zur Gewinnung parasitärer RNA aus dem Blutstadium wurde einer infizierten Maus durch Herzpunktion das Blut entnommen und die Parasiten über eine Saponinlyse (siehe 2.2.5) isoliert. Das erhaltene Parasitensediment wurde ebenfalls direkt mit R1-Puffer lysiert.

2.2.5 Saponinlyse

Mit Hilfe der Saponinlyse lassen sich die Membranen der Blutzellen auflösen. Die von einer parasitophoren Vakuole umgebenen Parasiten werden dabei jedoch nicht zerstört, so dass sich über dieses Verfahren Blutparasiten konzentrieren lassen.

Das infizierte Blut wurde zunächst mindestens fünfmal mit PBS gewaschen. Die Blutzellen wurden nach jedem Waschschrift bei 3000rpm zentrifugiert und der PBS-Überstand jeweils verworfen. Auf das sedimentierte Blut wurde anschließend 1ml einer 0,15%igen Saponin/PBS-Lösung gegeben. Unter leichtem Schütteln wurde dieses Gemisch dann 5min bei RT inkubiert und danach 10min bei 3000rpm zentrifugiert. Der nun das Hämoglobin enthaltende und daher rot gefärbte Überstand wurde wiederum verworfen, das Zellsediment mehrfach mit PBS gewaschen und

2. Material & Methoden

darauflin entweder zur Gewinnung von RNA (siehe 2.2.4) oder genomischer DNA (siehe 2.2.6) verwendet.

2.2.6 Isolierung genomischer DNA aus dem Blut infizierter Mäuse

Aus dem durch Herzpunktion gewonnenen Mausblut wurden durch Saponinlyse die Parasiten isoliert und in 200µl PBS resuspendiert. Die Isolierung genomischer DNA erfolgte dann nach Protokoll mit dem *QIamp[®]-DNA-Blood Mini-Kit*. Die DNA wurde in 200µl DNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Bis zu ihrer Verwendung wurde die genomische DNA bei -20°C gelagert.

2.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion ist die exponentielle Vervielfältigung ausgewählter DNA-Sequenzen mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase, der so genannten *Taq*-Polymerase. Das Enzym stammt ursprünglich von *Thermophilus aquaticus*, einem Archae-Bakterium, das in heißen Quellen vorkommt. Neben dieser allgemeinen *Taq*-Polymerase gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Modifikationen an Polymeraseproteinen, so dass diese nicht nur sehr schnell arbeiten, sondern die amplifizierte DNA auch auf Fehler hin kontrollieren und korrigieren. Bei den Klonierungsreaktionen in der vorliegenden Arbeit wurde die *PHUSION[™] High-Fidelity DNA Polymerase* der Firma Finnzymes verwendet. Sie arbeitet sehr schnell und hat dabei eine 50fach verringerte Fehlerrate als eine Standard-*Taq*-Polymerase.

Der PCR-Zyklus gliedert sich in drei Teile: Während der Denaturierung bei 94°C wird die DNA-Doppelhelix getrennt, so dass die DNA-Matrize in Form von Einzelsträngen vorliegt. Die anschließende Hybridisierung der Primer, das so genannte *Annealing*, erfolgt bei 50-60°C. Im Zuge der darauf folgenden Elongation findet die Neusynthese der DNA-Doppelstränge bei 72°C statt. Diese Temperatur entspricht dem Optimum der Polymerase. Für den PCR-Ansatz werden neben der DNA-Matrize, den entsprechenden Primern und der Polymerase alle vier Desoxyribonukleotid-triphosphate (dNTP) benötigt.

Die Reaktion erfolgt im so genannten *Thermocycler*, der automatisch die gewünschten Temperaturen erzeugt. Der PCR-Zyklus kann bis zu 35 Mal wiederholt werden, wobei darauf hingewiesen sei, dass sich mit Anstieg der Zykluszahl auch die Zahl der unspezifischen Bindungen von Primern vergrößert und Fehler auftreten

2. Material & Methoden

können. Nicht zuletzt wird die effiziente Wiederholung der Reaktion durch abnehmende Primer- und dNTP-Konzentrationen begrenzt. Durch die exponentielle Zunahme der DNA-Matrizen kann jedoch eine spezifische Amplifikation in beträchtlichem Umfang erfolgen.

2.2.8 Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine besondere Art der PCR, bei der das genetische Ursprungsmaterial mRNA ist. Die DNA-Polymerase kann RNA als Matrize nicht nutzen, weshalb diese zunächst in DNA umgeschrieben werden muss. Diesen Schritt katalysiert eine RNA-abhängige Polymerase, die Reverse Transkriptase. Die Synthese erfolgt am 3'-Ende eines Oligo-d(T)-Fragments von 10-15 Nukleotiden oder wird mit einem Gemisch kurzer Oligonukleotide gestartet. Das komplementär zur mRNA entstehende DNA-Fragment wird *complementary-DNA* (cDNA) genannt.

Für die cDNA-Synthese wurden 3µg RNA eingesetzt, die in RNase-freiem Wasser gelöst waren. Zu dieser RNA wurden 50ng Oligo-d(T) gegeben, welche komplementär an den poly-A-Schwanz der mRNA binden und so als Ansatzstelle für das Enzym dienen. Die Proben wurden auf ein Gesamtvolumen von ca. 10µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt.

Dieser Ansatz wurde 2min auf dem Thermoblock bei 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen in der RNA zu zerstören. Es wurden 0,4 Gesamtvolumenanteile 5x *first strand buffer*, 40mM DTT, 20mM eines Nukleotid-Mixes und 100U-200U Reverse Transkriptase zusammengegeben und der Reaktionsansatz mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt.

Es folgte die cDNA-Synthese für 90min bei 42°C im *Thermocycler* mit anschließender 10minütiger Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 72°C. Anschließend wurde 1µl RNase A (200µg/ml) zugegeben, um die restliche RNA innerhalb einer Stunde bei 37°C zu zerstören.

Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde der Reaktionsansatz auf 100µl mit A. bidest. aufgefüllt.

Da nach der cDNA-Synthese eine genaue Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure schwierig ist, wurden stets 10µl cDNA bei der folgenden PCR eingesetzt. Der Rest des Ansatzes wurde bei -70°C eingefroren.

2. Material & Methoden

Für die PCR wurde wiederum die *PHUSION*[™]-Polymerase verwendet. Für einen 50µl Reaktionsansatz wurden 5µl 10xReaktionspuffer, 25nM MgCl₂, 10mM dNTP und je 40pMol Primer eingesetzt. Anschließend wurde 1U Polymerase zugegeben und mit A. bidest. auf 50µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte nach festgelegtem Temperaturprogramm im *Thermocycler*, wobei die *Annealing*- sowie die Elongationszeit von den Primern bzw. der zu amplifizierenden Fragmentgröße abhängig ist.

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte stets auf einem 1%igen Agarosegel. Bei der Klonierung der sehr kleinen *pbexp1*-Signalsequenz wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet.

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA kann auf Grund ihrer vorwiegend negativen Ladung im elektrischen Feld wandern. Agarose kann dabei als Trägermatrix in Form eines Gels dienen. Durch unterschiedliche Agarosekonzentrationen variiert der Vernetzungsgrad bzw. die Porengröße des Gels, wodurch ein „Molekularsiebeffekt“ erreicht wird. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist hierbei ausschließlich von deren Größe und Konformation abhängig. Weitere Faktoren wie pH-Wert, Zusammensetzung des Gelpuffers, Höhe der elektrischen Spannung sowie die Porengröße des Agarosegels beeinflussen außerdem den Grad der Auftrennung. Durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid werden die Nukleinsäuren unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht, da die Fluoreszenzstärke von gebundenem gegenüber frei in Lösung vorliegendem Ethidiumbromid erhöht ist. UV-Licht der Wellenlänge 254-260nm wird von Nukleinsäuren absorbiert und auf den Fluoreszenzfarbstoff übertragen. UV-Licht der Wellenlänge 302 bzw. 360nm wird von Ethidiumbromid direkt absorbiert.

Es wurden 0,8-2,0%ige Horizontalgele gegossen. Die entsprechende Menge an Agarose wurde durch Aufkochen in 1xTBE bzw. 1xTAE gelöst und nach kurzer Abkühlung Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,2µg/ml zugegeben. Nach weiterem Abkühlen wurde die handwarme Gelmatrix in eine Gelapparatur gegossen, die sich bereits in der Elektrophoresekammer befand. Platzhalter sorgten während des Abkühlens für die nötigen Ladetaschen im Gel. Nach Erstarren der Trägermatrix wurden Gelbegrenzungen und Platzhalter entfernt und die Kammer vollständig mit

2. Material & Methoden

1xTBE bzw. 1xTAE befüllt. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumeneinheiten 6x Ladepuffer versetzt, welcher die Dichte der DNA-Lösung erhöht und somit eine Diffusion in den Laufpuffer verhindert. Zudem befand sich im Ladepuffer ein Farbstoff, mit welchem sich die Lauffront während der Auftrennung beobachten ließ. Um die Fragmentgröße der aufgetrennten DNA zu bestimmen, wurde stets ein Marker aufgetragen, der definierte DNA-Fragmente enthält. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 70-120V durchgeführt.

Die Dokumentation der Gele erfolgte an einem UV-Tisch mit Digitalkamera.

2.2.10 DNA-Reinigung

Chemische Fällung

Zum Aufkonzentrieren einer DNA-Menge wurde das Volumen zunächst mit A. bidest. auf 100µl aufgefüllt. Dazu wurde 3M Natriumacetat und das 2,5fache Volumen an 100%igem Ethanol gegeben. Nach guter Durchmischung wurde 5min bei 14.000rpm und RT zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde erneut kurz zentrifugiert und das restliche Ethanol vorsichtig abgesaugt. Schließlich wurde das DNA-Sediment im Thermoblock für 2min bei 65°C getrocknet und dann mit 50µl A. bidest. resuspendiert.

DNA-Reinigung mit dem Set *Nucleospin Extract 2*

Hierbei wurde sowohl für die Reinigung von DNA aus Agarosegelen und flüssigen Medien nach beigefügtem Protokoll vorgegangen.

2.2.11 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Für Transformationen müssen die eingesetzten Zellen besonders aufnahmefähig für Fremd-DNA, also kompetent, sein. Solche Bakterien kann man durch Zugabe chemischer Substanzen herstellen.

Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-Blue wurden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 3ml LB-Medium in einem Falcon-Probenröhrchen mit einer Kolonie von der Platte inokuliert und über Nacht bei 220rpm und 37°C geschüttelt. Von dieser Über-Nacht-Kultur wurden 2ml in 100ml LB-Medium gegeben und der gesamte Ansatz bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,3 geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur in

2. Material & Methoden

Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation bei 1580xg pelletiert. Nach gründlichem Entfernen des Überstandes wurde das gesamte Pellet in 1ml LB-Medium resuspendiert und dann vorsichtig mit 1ml 2xTSS vermischt. Die Suspension wurde für 30min auf Eis gestellt und anschließend in 100µl-Portionen aliquotiert. Diese wurden schließlich in einem Trockeneis/Methanol-Bad schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.12 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen

Es wurden 50µl kompetente Zellen langsam, auf Eis liegend, aufgetaut. 5-10µl der zu transformierenden DNA wurden nun in die Bakteriensuspension gegeben. Während einer Inkubationszeit von 30min lagerte sich die DNA an die Bakterienmembranen. Danach wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 45sek bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt. Wieder auf Eis liegend wurden nun 900µl SOC-Medium hinzugefügt und die Bakterien in Falcon-Röhrchen überführt. In einem Inkubator sollten die auf dem Plasmid kodierten Resistenz-Proteine exprimiert werden. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen der Bakteriensuspension auf Agarplatten, die mit einem dem Plasmid entsprechenden Antibiotikum versetzt waren, ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

2.2.13 Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Format

Hierbei wurde nach dem Standard-Protokoll des Sets *Nucleospin Plasmid* verfahren. 5ml einer Über-Nacht-Kultur der das Plasmid tragenden Bakterienzellen wurden für 30sek bei 13.000rpm zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien in 250µl A1-Puffer resuspendiert. Die Zugabe von 250µl A2-Puffer bewirkte die alkalische Lyse der Zellen, wodurch die Plasmid-DNA freigesetzt wurde. 300µl Puffer-A3 sorgten für die Neutralisation des Lysats und schafften bereits optimale Bedingungen für eine Bindung der Plasmid-DNA an eine Kieselgel-Säule. Die Zelltrümmer wurden zuvor durch Zentrifugation am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt und der Überstand, in dem sich auch das Plasmid befand, auf die Säule gegeben. Der Überstand wurde nun mit 13.000rpm per Zentrifugation durch das Säulenmaterial getrieben, wobei die Plasmid-DNA an die Oberfläche der Kieselgel-Matrix gebunden wurde. Mit Hilfe von 600µl Waschpuffer A4 wurden die Säule und das an ihr

2. Material & Methoden

gebundene Material von Verunreinigungen und Salzen befreit. Ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt entfernte den Waschpuffer von der Säule. In einem letzten Schritt wurde A. bidest. auf die Säule gegeben, das während der Zentrifugation die Plasmid-DNA von der Säule eluierte. Die Extinktion des Eluats wurde photometrisch bei 260nm bestimmt, wobei die Konzentration zwischen 200-800ng/µl liegen sollte.

2.2.13.1 Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Format mit Hilfe von Glasmilch

Diese kostengünstige Methode wurde vornehmlich bei Restriktionsanalysen angewendet. Dabei wurden 5ml einer über Nacht inkubierten Bakterienkultur zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien in 250µl STET-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 100µg Lysozym und 10minütige Inkubation auf Eis wurden die Bakterienzellen zerstört und durch Erhitzen der Suspension für 2min bei 95°C das Lysozym denaturiert. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis und anschließender 15minütiger Zentrifugation bei 14.000rpm wurde der Überstand dann zur Glasmilch gegeben. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus 500µl Natriumjodid und 10µl Glasmilch. Das Gemisch wurde zur Bindung der DNA an die Glasmilch 5min bei RT geschüttelt und dann bei 14.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurde das Glasmilch-Sediment mit 1ml *New-Wash*-Puffer gewaschen und wiederum bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Glasmilch-Sediment konnte bei 56°C im Thermoblock getrocknet und anschließend in 50µl destilliertem Wasser resuspendiert werden. Nach erneuter Zentrifugation befand sich die DNA im Überstand und konnte getrennt vom Glasmilch-Sediment bei -20°C eingefroren werden.

2.2.14 Präparation von Plasmid-DNA im Midi-Format

(*Nucleobond*[®] AX 100 von Macherey & Nagel)

Die Vorgehensweise dieser Methode ist der für das Mini-Format sehr ähnlich, jedoch ist hier die DNA-Ausbeute etwa 10fach erhöht. 50-90ml LB-Medium, versetzt mit den jeweiligen Antibiotika, wurden mit den Bakterienzellen, die das interessierende Plasmid beinhalten, inokuliert und bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Die Sedimentation erfolgte bei 8000rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Resuspensionspuffer S1 aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 4ml Lysispuffer S2. Die Suspension wurde unter vorsichtigem

2. Material & Methoden

Schwenken gemischt und nicht länger als 5min bei RT inkubiert. 4ml des Puffers S3 führten zur Neutralisation der Lösung, welche abermals vorsichtig geschwenkt wurde. Eine Präzipitation chromosomaler DNA sowie der Zelltrümmer wurde durch eine 30minütige Ultrazentrifugation bei 10.000rpm und 4°C erreicht. In der Zwischenzeit wurde die Säule mit 2ml des im Set vorhandenen Puffers N2 äquilibriert. Der nach der Zentrifugation sichtbare klare Überstand wurde auf die Säule gegeben. Nachdem der Überstand durch die Säule gelaufen und somit die Plasmid-DNA an die Kieselgel-Matrix gebunden war, erfolgten zwei Waschschrte mit je 5ml Puffer N3. Eine Elution der Plasmid-DNA wurde mit 5ml des Puffers N5 erreicht.

Bei der Midi-Präparation war außerdem eine Präzipitation der Plasmid-DNA erforderlich. Die eluierte Fraktion wurde durch Zugabe von 0,8 Volumeneinheiten Isopropanol in einer 30-minütigen Zentrifugation bei 10.000rpm und 4°C präzipitiert. Die Nukleinsäure wurde dann in 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 10min bei 10.000rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Alkohol abgenommen, das Pellet getrocknet und in 100µl A. bidest. resuspendiert.

2.2.15 Insertion von DNA-Sequenzen in Plasmide

Um eine bestimmte Gensequenz in ein Plasmid einzubauen, muss das Plasmid an genau definierter Stelle durch ein entsprechendes Restriktionsenzym geschnitten werden. Zu diesem Zweck geben biotechnologische Firmen für die von ihnen hergestellten Plasmide so genannte Plasmidkarten heraus. Auf diesen sind alle Restriktionsenzymchnittstellen sowie zusätzliche Eigenschaften, wie z.B. weitere Gene, angegeben. Auf vielen Plasmiden ist eine so genannte *multiple-cloning-site* (MCS) definiert. In diesem Bereich befinden sich besonders viele Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme. Wurde ein Restriktionsenzym verwendet, das nur eine Schnittstelle im Plasmid besitzt oder ein Fragment herausgeschnitten, so liegt das restliche Plasmid nach erfolgter Reaktion linearisiert vor.

Um eine Religation der Plasmidenden zu vermeiden, wurden diese mit einer sauren Phosphatase behandelt. Hierzu wurde 1µl des Enzyms zu 50µl DNA-Lösung gegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Der zu inserierende DNA-Abschnitt wurde stets mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelt wie das Plasmid, in welches diese Region integriert werden soll. Diese Abschnitte wurden jedoch nicht mit

2. Material & Methoden

Phosphatase inkubiert, so dass ausgehend von diesen 5'- bzw. 3'Enden eine Ligation stattfinden konnte. Zur Ligation wurden die *Insert*-Mengen bei festgelegter Plasmidmenge nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{ng Plasmid} \times \text{Kb Insert}}{\text{Kb Plasmid}} \times 3 = \text{ng Insert}$$

Die Ansätze wurden mit 2µl 10fach-Ligasepuffer und 1µl T4 DNA Ligase (20U) angesetzt und mit DNase-freiem A. dest. auf 20µl aufgefüllt. Die Reaktion verlief innerhalb von 12h bei 16°C im *Thermocycler*.

Konstrukt pGEX6P1 mit *pb/lsa4* (gesamt)

Das Plasmid pGEX6P1 enthält in 5'Richtung der MCS ein Gen, das für die Gluthation-S-Transferase (GST) kodiert. Eine Insertion in die MCS ergibt demnach ein Fusionsprotein mit N-terminal vorgelagertem GST. Bei der Klonierung des *gst-pb/lsa4*-Konstruktes wurden die Schnittstellen *BamHI* und *XhoI* verwendet und das mit den Primern 614 und 671 amplifizierte *pb/lsa4*-Gen inseriert.

Konstrukt pJC45 mit *pb/lsa4* (533bp)

Das Plasmid pJC45 fusioniert N-terminal 10 Histidin-Aminosäuren an das folgende Protein. Die Klonierung erfolgte über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* mit den Primern 508 und 507.

Konstrukt pL0017 mit Promotorregion *pb/lsa4*

Bei diesem Konstrukt wurden die Restriktionsendonukleasen *NheI* und *BamHI* verwendet, was zunächst dazu führte, dass der konstitutive Promotor *pbeef1aa* (Elongations-Faktor-1-alpha) vor dem *gfp*-Gen entfernt wurde. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die Plasmidbande ausgeschnitten und gereinigt. Zwischenzeitlich wurde aus genomischer DNA die Promotorregion des *pb/lsa4*-Gens mit den Primern 599 und 601 amplifiziert und mit dem Plasmid zum pPrLSA4-Konstrukt ligiert.

2. Material & Methoden

Abb.2.1: Plasmidkarte pL0017

Bildquelle:

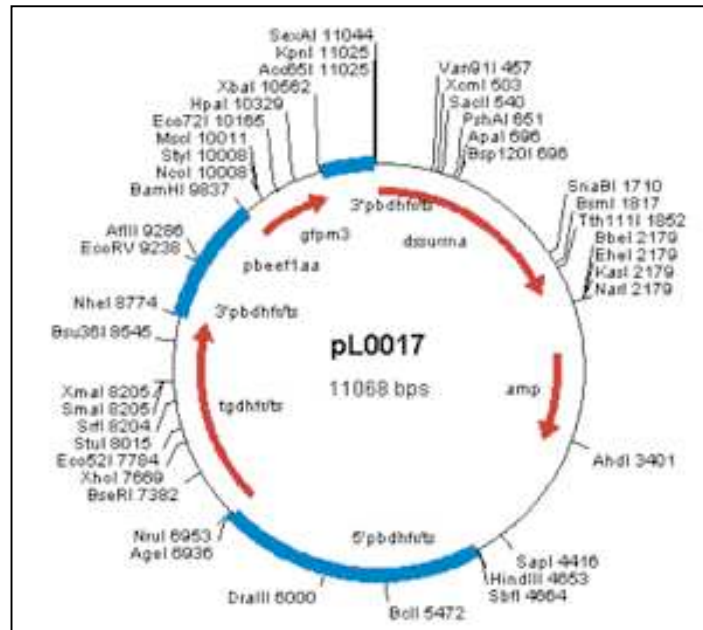
MR4/American Type Culture Collection

10801 University Blvd.

Manassas, VA 20110-2209

Email: malaria@atcc.org;

web site: www.malaria.mr4.org



Konstrukt pPrLSA4 mit Gen *pblsa4*

Das Plasmid pPrLSA4 wurde zunächst durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI linearisiert. Anschließend wurde das mit den Primern 614 und 615 amplifizierte *pblsa4*-Gen in das Plasmid ligiert. Da hierbei sowohl am 5'- als auch am 3'Ende des *pblsa4*-Gens die *Bam*HI-Schnittstelle verwendet werden musste, konnte das *Insert* in zwei möglichen Orientierungen eingefügt werden. Die richtige Orientierung wurde durch Restriktionsanalysen, PCR und schließlich durch Sequenzierung ermittelt. Ergebnis der Klonierung war das Plasmid pPbLSA4GFP.

Konstrukt pPrLSA4 mit dem Gen *hlyA* (L461T)

Aus dem pPrLSA4-Konstrukt wurde durch den Einsatz der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xba*I das Gen entfernt, das für GFP kodiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung dieses Verdau wurde die Plasmidbande ausgeschnitten und gereinigt. Danach wurde das mit den Primern 703 und 704 amplifizierte *hlyA*-Gen, welches für Listeriolysin kodiert, in das Plasmid ligiert. Diesem Gen fehlte die bakterielle Signalsequenz, welche durch das Programm Signal IP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk>) identifiziert wurde. Das resultierende Plasmid wurde pPrLSA4LLO genannt.

2. Material & Methoden

Konstrukt pPrLSA4LLO mit der Signalsequenz von *exp1*

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde durch *BamHI*-Restriktion zunächst das pPrLSA4LLO-Plasmid linearisiert. Anschließend wurde der durch die Primer 701 und 702 amplifizierte Genabschnitt, der für das Signalpeptid von *Exp1* kodiert, in das Plasmid ligiert. Auch bei diesem Konstrukt waren wieder zwei mögliche Orientierungen zu berücksichtigen. Die richtige konnte durch Sequenzierung und PCR identifiziert werden. Das Plasmid wurde pPrLSA4XP1LLO genannt.

Konstrukt pPrLSA4 mit der Signalsequenz von *exp1*

Auf die gleiche Weise wie im vorigen Abschnitt wurde die *exp1*-Signalsequenz mit dem *gfp*-Gen fusioniert. Auch hier erfolgte die Insertion über die *BamHI*-Schnittstelle. Das Konstrukt trägt die Bezeichnung pPrLSA4XP1GFP.

Konstrukt pPrLSA4LLO mit dem Gen *pblsa4*

Als Ausgangsplasmid wurde das pPrLSA4LLO-Plasmid verwendet. Es wurde durch Restriktion mit *BamHI* linearisiert und das Gen *pblsa4*, welches von *BamHI*-Restriktionsstellen flankiert wurde, eingefügt. Auch hier wurden die Primer 614 und 615 verwendet, und auch in diesem Falle wurde die korrekte Orientierung des Gens durch Kontrollverdau und Sequenzierung überprüft.

Konstrukt pL0031 und die Kernregion des Gens *pblsa4*

Bei diesem Konstrukt handelt es sich um das Insertions-Plasmid, dass in den genomischen Locus von *pblsa4* integriert wurde, um ein unvollständiges Protein zu exprimieren. Mit den Primern 710 und 711 wurde zunächst der Kernbereich des *pblsa4*-Gens amplifiziert und an den Schnittstellen *XbaI* und *BamHI* in das pL0031-Plasmid integriert. Um nach Transfektion in die Parasitenzelle die Insertion des als pL0031KO2-Plasmid bezeichneten Konstrukts in das *pblsa4*-Gen zu ermöglichen, musste das Plasmid linearisiert werden, so dass sich am 5'- bzw. 3'Ende des Plasmids etwa 250bp des *pblsa4*-Gens befinden. Weil an dieser Position keine geeignete Schnittstelle für eine Endonuklease vorlag, musste dort eine Schnittstelle eingefügt werden. Da durch Linearisierung des pL0031-Plasmids mit *XbaI* und *BamHI* die Schnittstelle *SpeI* aus dem Plasmid entfernt wurde, sollte diese in die Kernregion des *pblsa4*-Gens integriert werden. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass keine weitere Schnittstelle für *SpeI* im Plasmid vorliegt.

2. Material & Methoden

Abb.2.2: Plasmidkarte pL0031

Bildquelle:

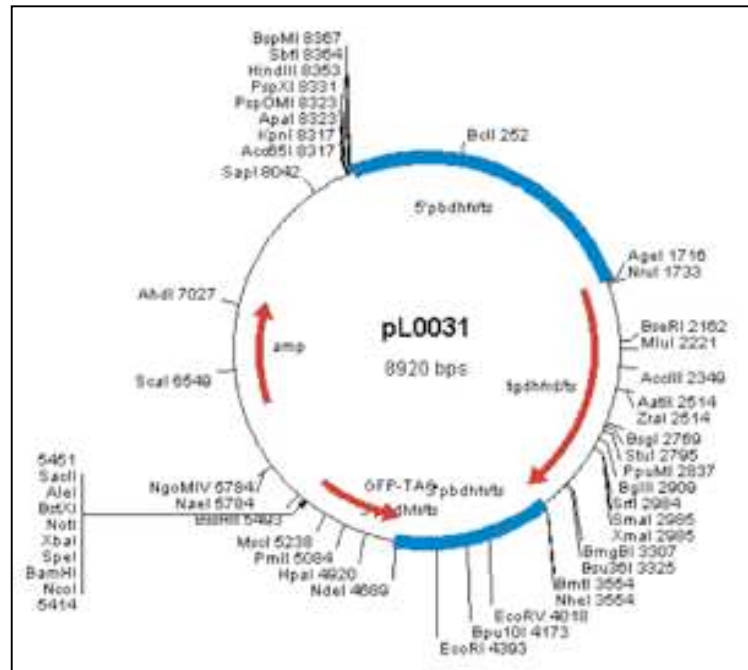
MR4/American Type Culture Collection

10801 University Blvd.

Manassas, VA 20110-2209

Email: malaria@atcc.org;

web site: www.malaria.mr4.org



Konstrukte zur Verkürzung der Promotorregion

Als Ausgangsplasmid wurde pL0017 mit herausgeschnittenem Promotor *pbeef1aa* verwendet. Die Verkürzung des Promotorbereichs resultierte in den jeweils kleineren PCR-Fragmenten, die ligiert wurden. Bei konstantem *reverse*-Primer (601) variierten nur die *forward*-Primer (880-884). Die Konstrukte wurden jeweils nach ihren *forward*-Primern benannt (siehe Abb. 3.12).

2.2.16 Einführung einer spezifischen Schnittstelle in eine Genregion (Mutagenese)

Ausgangsmaterial für die Mutagenese war das Plasmid pL0031KO2. Es sollte mit einer PCR komplett amplifiziert und zusätzlich an spezifischer Position eine Punktmutation eingeführt werden. Die für die PCR nötigen Primer mussten für die Mutation bestimmte Voraussetzungen erfüllen: Sie mussten komplementär zueinander und bis auf die zu mutierende Position auch identisch mit der komplementären Region im Plasmid sein und außerdem besonders lang, also ihre *Annealing*-Temperatur hoch sein. Im vorliegenden Fall lag diese Temperatur für die verwendeten Primer bei 71°C. Eine weitere Veränderung gegenüber einer Standard-PCR war die Tatsache, dass zu PCR-Beginn zunächst nur der *forward*-Primer im Reaktionsansatz war, so dass Kopien dieses DNA-Stranges angehäuft wurden. Sie

2. Material & Methoden

verhinderten, dass der anschließend hinzugefügte komplementäre *reverse*-Primer nur an den *forward*-Primer bindet und nicht am eigentlichen *template* (Plasmid).

Als Polymerase wurde die *Mid-Range-taq* verwendet, die neben einer schnellen *Taq*-Polymerase auch eine *proofreading*-Kontrolle besitzt, also den neu synthetisierten Strang auf Lesefehler hin kontrolliert. Dabei werden jedoch nur die durch die Polymerase verlängerten Stränge kontrolliert und nicht die durch die Primer bereits vorgegebenen Doppelstränge. Die Punktmutation, die durch die Primer verursacht wurde, bleibt also bestehen. Nach der PCR wurde der *Thermocycler* noch für einen Restriktionsverdau durch *DpnI* genutzt. Diese 4-Basen-Restriktionsendonuklease schneidet nur dann die DNA, wenn diese methyliert ist. Methylgruppen werden z.B. in Bakterienzellen an die DNA gebunden, weshalb die *template*-DNA zerstört wird, jedoch nicht die durch die PCR neu synthetisierten Stränge.

Eine PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

94°C / 2min	
{ 94°C / 30sek	} 15 Zyklen
{ 55°C / 30sek	
{ 68°C / 9,5min	
68°C / 10min	
4°C / 2min	⇒ Zugabe der Restriktionsendonuklease <i>DpnI</i>
37°C / 60min	
4°C / ∞	

Nach dem *DpnI*-Verdau konnten die neu synthetisierten Plasmide transformiert werden. Die bei den Primern entstehenden Lücken werden dann in der Bakterienzelle repariert. Die aus den Bakterien gewonnenen Plasmide wurden durch *SpeI*-Verdau und Sequenzierung überprüft.

2.2.17 Durchführung eines Kontrollverdaus

Der Einbau eines Gens in ein Plasmid kann mit einem so genannten Kontrollverdau überprüft werden. Hierbei wird ein Restriktionsenzym verwendet, welches im Plasmid und im eingesetzten Gen genau definierte Schnittstellen besitzt. Auf diese Weise

2. Material & Methoden

kann nicht nur die Anzahl der durch diesen Verdau entstehenden Fragmente bestimmt werden, sondern auch ihre Größe.

Nur wenn dieser Kontrollverdau in Anzahl und Größe der Vorhersage entsprach, wurde mit diesem Plasmid weitergearbeitet. Es wurden stets 100ng Plasmid-DNA eingesetzt. Dazu wurde ein Volumenprozent des jeweiligen Enzympuffers und gegebenenfalls A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 10µl aufgefüllt. Nach einstündiger Inkubation bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur (meist 37°C) wurde der Reaktionsansatz mit 2µl Ladepuffer versetzt und durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.18 Transfektion von Plasmiden in *P. berghei*

Um die oben beschriebenen Konstrukte in *P. berghei*-Zellen zu transfizieren, wurde die Veröffentlichung von Janse *et al.* (2006) zu Grunde gelegt. Transfiziert wurden stets Schizonten der Blutphase, die für eine effiziente Transfektion sowohl von den anderen Parasitenphasen als auch von nicht infizierten Zellen getrennt werden mussten.

Für eine Transfektion von etwa 10 Konstrukten wurden 2-3 infizierte NMRI-Mäuse verwendet. Diese wurden bei einer Blut-Parasitämie von 1-3% getötet und durch Herzpunktion ausgeblutet. Das infizierte Blut wurde in 5ml warmem Komplettmedium aufgenommen. Das Medium wurde während der Herzpunktion in einem 50ml-Falcon-Gefäß im Wasserbad warm gehalten. Nach 8minütiger Zentrifugation bei 450xg wurde der Überstand (Medium und Mausserum) verworfen. Die sedimentierten roten Blutzellen konnten in 50ml Komplettmedium resuspendiert werden. Dieses Blut-Medium-Gemisch wurde in eine 250ml-Zellkulturflasche umgefüllt und mit einem Stickstoff-Sauerstoff-Kohlendioxid-Gemisch (90%, 5%, 5%) begast. Auf einem Horizontalschüttler, der im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂-Gas stand, wurde das Blut-Medium-Gemisch so geschüttelt, dass sich keine Blutzellen am Flaschenboden absetzen konnten. Die Blutzellen wurden etwa 18h inkubiert. Infizierte Zellen entwickelten sich dabei zu dem Schizontenstadium weiter. Nach Bestätigung der Schizontenentwicklung durch einen Blutausschich wurde der so genannte Nycodenz[®]-Gradient vorbereitet: 138g des Nycodenz[®]-Pulvers wurden in 500ml gepuffertem Medium gelöst. Aus der Nycodenz[®]-Stammlösung wurden 27,5ml entnommen und in einem Falcon-Gefäß mit 22,5ml PBS aufgefüllt. Mit je 10ml dieser Lösung wurden

2. Material & Methoden

30-35ml Kulturblut unterschichtet. Dazu wurde eine 10ml-Pipette in 30ml Blutkultur eingeführt, bis diese den Boden des Falcon-Gefäßes berührte. Nun wurde vorsichtig die Nycodenz[®]-Lösung in das Blut gegeben. Die anschließende Zentrifugation erfolgte in einem *Swing-out*-Rotor für 20min bei 450xg und resultierte in vier sichtbaren Phasen. Am Boden des Falcon-Gefäßes befanden sich die nicht-infizierten roten Blutzellen sowie die kleineren Entwicklungsstadien infizierter Blutzellen. Dann folgte eine klare Nycodenz[®]-Schicht, und darüber war die Schizontenschicht als brauner Ring sichtbar. Darüber lag die größte Phase, nämlich das sich in der Blutkultur befindliche Medium, welches auch für die weiteren Waschschrte wieder verwendet wurde. Mit einer Glaspipette wurden nun vorsichtig die Schizonten abgetragen und in ein weiteres Falcon-Gefäß überführt. Aus allen Gradienten-Ansätzen ergab sich meist ein Volumen von ca. 25ml, welches auf 40ml mit Medium aufgefüllt wurde. Um Nycodenz[®]-Reste aus der Schizonten-Lösung zu entfernen, wurde ein weiteres Mal für 8min bei 450xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Blut-Sediment enthielt nun vorrangig gereinigte Schizonten, die transfiziert werden konnten. Um zehn Transfektionen durchzuführen, wurde das sedimentierte Blut zunächst in 1ml Medium resuspendiert und schließlich auf 10ml aufgefüllt. Nun wurden die Schizonten zu je 1ml auf zehn Eppendorf-Gefäße verteilt und für 5sek bei 16.000rpm zentrifugiert. Dadurch bildete sich wiederum ein Blutpellet, das nun mit der vorbereiteten Nucleofektor-Lösung gemischt wurde. Die Nucleofektor-Lösung A88A6 wurde aus dem *Amaxa*-Transfektions-Set für humane T-Zellen entnommen und mit 5-10µg zu transfizierender DNA vermischt. Das Blutpellet wurde in 100µl resuspendiert und in eine *Amaxa*-Transfektionsküvette überführt. Die Transfektion wurde in einem *Amaxa* Nucleofektor nach dem Programm U-033 durchgeführt. Direkt im Anschluss an die Elektroporation wurden den 100µl noch 50µl Medium zugefügt. Die 150µl wurden in Eppendorf-Gefäße pipettiert und mit einer Insulin-Spritze aufgenommen. Nun wurden die transfizierten Schizonten über die Schwanzvene in neue NMRI-Mäuse injiziert und mit Hilfe von 7mg/ml Pyrimethamin im Trinkwasser der Mäuse ein Selektionsdruck auf die Parasiten ausgeübt. Bei einer Parasitämie von ca. 8% wurden nicht infizierte NMRI-Mäuse durch Bluttransfer infiziert sowie infiziertes Blut kryokonserviert. Mit den reinfizierten Mäusen wurden *A. stephensi*-Moskitos infiziert. Nach 14-21 Tagen konnten aus den Speicheldrüsen der Mücken die Sporozoiten gewonnen werden, mit denen dann HepG2-Zellen infiziert wurden.

2. Material & Methoden

2.2.19 Kryokonservierung von infiziertem Mausblut

Um infiziertes Blut in flüssigem Stickstoff zu lagern, war es zuvor notwendig, ein spezielles Einfriermedium herzustellen. Dazu wurden 9ml *Alseviers-Solution* mit 1ml Glycerol vermischt und in Kryo-Gefäßen vorgelegt. Zu 200µl dieser Lösung wurden 100µl infiziertes Blut gegeben, vermischt und eingefroren.

Um das konservierte Blut einzusetzen, wurde es mit 300µl PBS gemischt und hiervon 200-300µl einer Maus injiziert.

2.2.20 Proteinexpression in *E. coli*-BL21(rig)-Zellen

Zunächst wurde eine Transformation von *E. coli*-BL21-Zellen mit dem Expressionsplasmid (1µg Plasmid/50µl Bakterien) durchgeführt. Diese Bakterien wurden auf 100µg/ml-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und konnten so vereinzelt werden. Eine einzelne positive Kolonie wurde in 50ml LB/Amp-Medium für 24h bei 37°C inkubiert und anschließend 1:10 in 500ml LB-Medium verdünnt. Dieser Ansatz wurde nochmals 3h bei 37°C im Schüttler inkubiert und danach 1mM IPTG zugegeben. Das IPTG induzierte die Expression des GST-Fusionsproteins. Vor Zugabe des IPTG wurden 5ml Bakteriensuspension als Negativ-Kontrolle abgenommen.

2.2.21 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Untersuchung des Proteins erfolgte stets durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

SDS (Natriumdodecylsulfat) besteht aus einer aliphatischen Kette von 12 Kohlenstoffatomen mit einer hydrophilen Sulfatgruppe. Diese Kette lagert sich entlang der Aminosäuren der Proteine an und bildet einen SDS-Proteinkomplex, dessen Oberfläche nach außen gerichtet negative Sulfatgruppen aufweist. Die Eigenladung des Proteins ist dann im Vergleich zur negativen Gesamtladung nicht von Bedeutung. Das Verhältnis zwischen Ladung und Masse ist konstant. Bei einem Polyacrylamidgel mit Molekularsiebeffekt ist damit die Bewegung eines Proteins proportional zum Logarithmus der relativen Molekülmasse. Die Auftrennung erfolgt also nur nach dem Molekulargewicht, das anhand des verwendeten Proteinstandards ermittelt werden kann.

2. Material & Methoden

Zunächst wurde das Trenngel vorbereitet. Dazu wurden die unten aufgeführten Reagenzien zusammengegeben. Für die verwendete *Hoefler Mighty Small II*-Acrylamid-Gelkammer wurden folgende Mengen verwendet:

	10%ig	12%ig
A. dest.	4,1ml	3,4ml
Tris 1,5M pH 8,8	2,5ml	2,5ml
Acrylamid (30%ig)	3,3ml	4,0ml
TEMED	5µl	5µl
APS (10%ig)	50µl	50µl

Das APS wurde erst kurz vor dem tatsächlichen Gießen des Gels hinzugefügt.

Der Trenngel-Ansatz wurde in die Gelkammer pipettiert und mit Isopropanol überschichtet, was auf dem Gel zur Bildung einer glatten, blasenfreien Oberfläche führt.

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel vorbereitet.

Hierfür wurden folgende Reagenzien zusammengefügt:

	4%ig
A. dest.	3,05ml
Tris 1,5M pH 6,8	1,25ml
Acrylamid (30%ig)	650µl
TEMED	5µl
APS (10%ig)	25µl

War das Trenngel auspolymerisiert, wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel-Gemisch vorsichtig in die Kammer gegeben. Ein Kunststoffkamm hielt dabei die Taschen für die Proben frei. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, und die Taschen mit A. dest. gespült. Die Glasplatten mit dem dazwischen liegenden Gel wurden nun in die eigentliche Laufkammer gestellt. Diese wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Taschen mit geringen Mengen 2x Lämmli-Puffer sichtbar gemacht.

2. Material & Methoden

Alle Proben wurden in Lämmli-Puffer angesetzt und vor Befüllen der Geltaschen bei 95°C erhitzt. In die Geltaschen wurden Volumina bis 15µl gefüllt und eine Spannung von 25mA pro Gel angelegt.

2.2.22 PREP-Cell-Verfahren

Proteinaufreinigung mit Hilfe einer so genannten Mini-*PREP*-Zelle (*Bio-Rad*) bedient sich des Trennungseffekts der SDS-Gelelektrophorese. Es handelt sich ebenfalls um eine Elektrophoresekammer, doch werden hier nicht verschiedene Proben miteinander verglichen, sondern ein Proteingemisch aufgetrennt. Dennoch werden ein Trenn- und Sammelgel gegossen, doch wird bei letzterem kein Kamm zur Bildung von Taschen verwendet. Die Proteinprobe wird direkt auf das Sammelgel gegeben und wandert nach Anlegen einer Stromspannung in Richtung Pluspol durch das Gel. Dabei werden die in der Probe vorhandenen Proteine der Größe nach aufgetrennt und verlassen das Gel schließlich. Die aus dem Gel laufenden Proteine werden in Elutionspuffer aufgenommen und in einem Fraktionssammler aufgefangen. Nun können die verschiedenen Fraktionen auf die Gegenwart des gesuchten Proteins hin untersucht werden. Dabei sind die Proben meist so sauber, dass sie direkt zur Immunisierung verwendet werden können. Zur Reinigung des rekombinanten PbLSA4-Proteins aus Bakterienlysat wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel gegossen. Für die Mini-*PREP*-Zelle (*Bio-Rad*) wurden folgende Reagenzien zusammengefügt:

<u>Trenngel (10%ig)</u>		<u>Sammelgel (4%ig)</u>	
A. dest.	8,27ml	A. dest.	6,1ml
Tris 1,5M pH 8,8	5,0ml	Tris 0,5 M pH 6,8	2,5ml
Acrylamid (30%ig)	6,67ml	Acrylamid (30%ig)	1,33ml
TEMED	5µl	TEMED	10µl
APS (10%ig)	50µl	APS (10%ig)	50µl

Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurde 1ml in 1xLämmli-Puffer gelöstes Proteingemisch (aus 200ml Bakterienkultur) bei 95°C gekocht und anschließend vorsichtig auf das Sammelgel geschichtet. Bei einer Stromspannung von 15V wurde die Trennung über 12h durchgeführt, wobei ein Fraktionssammler die aus dem Gel austretenden Proteine mit Elutionspuffer in einem Volumen von je 4ml auffing. Die

2. Material & Methoden

verschiedenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE mit dem IPTG-induzierten Totallysat verglichen. Das rekombinante GST-PbLSA4-Fusionsprotein wurde mit einer Größe von 72kDa detektiert. Eine BRADFORD-Proteinbestimmung dieser Fraktion ergab einen Wert von ca. 200µg/ml Protein, daher musste der Proteingehalt in den 4ml nicht weiter konzentriert werden.

2.2.23 Fixierung und Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung durch eine SDS-PAGE können Proteine im Gel fixiert und gleichzeitig angefärbt werden.

Die Fixierung und Färbung erfolgte für mindestens 30min in einer Methanol/Essigsäure-Lösung, der ein Triphenylmethan-Textilfarbstoff (*Coomassie brilliant blue* R250) zugesetzt war. Um überflüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde das Gel in eine farblose Methanol/Essigsäure-Lösung überführt und für ca. 1h inkubiert. Das noch feuchte Gel wurde dann auf dünne, nasse Gelatine-Blätter gelegt, mit Klammern fixiert und getrocknet.

2.2.24 Immunisierung von NMRI-Mäusen

Das gereinigte GST-PbLSA4-Fusionsprotein wurde zur Immunisierung zweier NMRI-Mäuse verwendet und anschließend das Antiserum isoliert.

Für den ersten Immunisierungsschritt wurden 300µl *Complete Freund's Adjuvant* mit 300µl GST-PbLSA4-Fusionsprotein vermischt, was einer Proteinmenge von etwa 36µg entsprach. Dazu wurde das Gemisch solange in einer Spritze aufgezogen und wieder ausgepresst, bis es die Konsistenz einer dickflüssigen bis schaumigen Emulsion zeigte. Je 300µl dieser Mischung wurde den Mäusen intraperitoneal injiziert. Die Immunisierung wurde dreimal im Abstand von zwei Wochen wiederholt, wobei hier *Incomplete Freund's Adjuvant* verwendet wurde. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurde eine Blutprobe von ca. 50µl aus dem Schwanz der jeweiligen Maus entnommen und in einer *Western-Blot*-Analyse auf Antikörper hin untersucht. Nachdem ein ausreichender Antikörper-Titer festgestellt werden konnte, wurde die Maus getötet und das Herz punktiert. In Vorbereitung der Blutentnahme wurde ein kleiner Tropfen Heparin (ca.10µl) in ein leeres Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Zusätzlich wurde eine 1ml Spritze mit Kanüle heparinisiert (dadurch wird die

2. Material & Methoden

Blutgerinnung innerhalb der Arbeitsgefäße verhindert). Durch Herzpunktion konnte der Maus 1ml Blut entnommen werden.

Die Zentrifugation bei 1000rpm bewirkte die Sedimentation der roten Blutkörperchen, so dass der Überstand mit dem Antiserum abgenommen werden konnte. Das Antiserum wurde aliquotiert und zunächst bei -20°C gelagert und nach dem ersten Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

2.2.25 Western-Blot-Analysen

Im Anschluss an eine SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurden eine *Blot*-Apparatur, zugeschnittene Whatman-Filter und eine Nitrozellulosemembran benötigt. Das *Blot*-Gestell bestand aus zwei Kunststoffgittern und zwei flachen Schwämmen. Diese wurden zusammen mit den Filterscheiben und der Membran in Transferpuffer eingeweicht. Das *Blot*-Gestell wurde nun wie folgt zusammengesetzt:

Kunststoffgitter \Rightarrow Schwamm \Rightarrow 2 Filterscheiben \Rightarrow Nitrozellulosemembran \Rightarrow SDS-Polyacrylamidgel \Rightarrow 2 Filterscheiben \Rightarrow Schwamm \Rightarrow Kunststoffgitter.

Die Apparatur wurde verschlossen und so in die *Blot*-Kammer gestellt, dass die Proteine zur Anode wandernd auf die Nitrozellulosemembran transferiert wurden. Die *Blot*-Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und eine Stromstärke von 400mA angelegt. Der Vorgang dauerte insgesamt eine Stunde und wurde manuell gestoppt. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend in 5% Magermilch in 100ml $\text{TBS}_{\text{Tween}}$ für 30min geschwenkt. Dadurch wurden alle potentiellen Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Die Membran wurde in 5ml einer 3%igen Milch/primärer Antikörper-Lösung für 1h inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen mit $\text{TBS}_{\text{Tween}}$ wurde die Membran in 5ml 3%iger Milch/sekundärer Antikörper-Lösung für 1h inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist gegen die primären Antikörper gerichtet und außerdem mit der *horseradish*-Peroxidase (*HRP*) gekoppelt. Dieses Enzym oxidiert Luminol in alkalischer Lösung und in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu 3-Aminophtalat, wobei Licht in einer Wellenlänge von 425nm emittiert wird. Die Lichtreaktion wurde auf Fotopapier detektiert.

2. Material & Methoden

2.2.26 Southern-Blot-Analysen als Integrationskontrolle

Ein *Southern-Blot* ist ein Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Membranen. Bei dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *Southern-Blot* ist das Ausgangsmaterial *XbaI*-verdaute genomische DNA des Parasiten *P. berghei*. Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,8%igen Agarose-TAE-Gel getrennt und 0,2µg/µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Als nächster Schritt folgte die Depurination. Hierbei wurde das Agarosegel 15min in einer 250mM HCl-Lösung geschwenkt. Danach wurde das Gel in A. bidest. gewaschen und für 30min in das Denaturierungsbad gelegt. Dieses bestand aus 1,5M NaCl und 0,5M NaOH und führt zur Trennung der beiden komplementären DNA-Stränge. Die anschließende 30minütige Inkubation in Neutralisierungspuffer (1,5M NaCl und 0,5M Tris-HCl) ist notwendig, weil die DNA im alkalischen Milieu nicht mehr effektiv an die Nylonmembran bindet und diese zusätzlich brüchig werden kann. Der Transfer der einzelsträngigen DNA erfolgte durch Kapillarkräfte innerhalb von 12h. Dazu wurde das Agarosegel auf eine Folie gelegt und mit reichlich SSC-Puffer benetzt. Dann wurde die Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit 4 Abschnitten Whatman-Filter und mehreren Abschnitten von Labortüchern belegt. Zuletzt wurde der *Blot*-Stapel noch mit einem Gewicht beschwert und damit der Transfer gestartet.

Danach wurde die transferierte DNA auf der Membran durch 2minütige UV-Bestrahlung fixiert. Nun wurde die Membran mit unspezifischer Herings-Sperma-DNA gesättigt, um eine Fehlbindung der DNA-Sonde zu verhindern. Dazu wurde die Membran bis zu 6h in 5xSSC-Puffer inkubiert, in welchem neben 0,1% SDS und 5% Dextran-Sulfat auch eine 20fache Verdünnung des so genannten *Liquid-Block* (enthält denaturierte Heringssperma-DNA) gehört. Die Inkubation erfolgte bereits im 60°C warmen Hybridisierungssofen. In diesem erfolgte für 24h auch nach Sättigung der Membran die Anlagerung der DNA-Sonde. Der hierfür verwendete Sättigungspuffer enthielt 6-8ng/ml der spezifischen Fluorescein-markierten DNA-Sonde. Im Anschluss an die Anlagerung wurden intensive Waschschrte in SSC-Puffer mit abnehmender Salzkonzentration vorgenommen. Bevor nun das an die DNA-Sonde gebundene Fluorescein durch einen Anti-Fluorescein-Antikörper gebunden werden konnte, wurde die Membran nochmals mit einem Blockpuffer bei RT inkubiert. Dieser enthielt wiederum das *Liquid-Block*-Reagenz in einer 1:10 Verdünnung und zusätzlich den Puffer A (300mM NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 9,5). Der genannte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in Puffer A mit der

2. Material & Methoden

Membran inkubiert (1h bei RT). Das an den Antikörper gebundene Enzym konnte nach dreimaligem Waschen der Membran mit Puffer A und 0,3% Tween20 das *CDP-Star-Detektions-Reagenz* zu einer Lichtreaktion umsetzen, was auf einem Film sichtbar gemacht werden konnte.

2.2.27 Herstellung einer spezifischen DNA-Sonde

Um eine für den *Southern-Blot* geeignete DNA-Sonde herzustellen, wurde ein vorhandenes Plasmid eingesetzt, in dem der DNA-Abschnitt liegt, welcher als Sonde benutzt werden soll. 25ng/µl dieses Plasmids wurden durch 5minütiges Erhitzen bei 95°C denaturiert und dem Reaktionsansatz zugefügt. Des weiteren enthielt dieser Ansatz neben gereinigtem Wasser auch die zum *CDP-Star-Set* gehörigen Nukleotide, welche jeweils mit Fluorescein markiert sind und somit auch das spätere Amplifikations-Produkt mit diesem Molekül versehen. Nun wurden nur noch je 200pM der spezifischen Oligonukleotide und die Enzymlösung, die dem Set beiliegt, zugefügt. Sie enthält das *Klenow*-Enzym, bei welchem es sich um eine Polymerase handelt. Damit entspricht die Herstellung einer DNA-Sonde einer DNA-Polymerisierung, bei der die Nukleotide mit Fluorescein markiert sind.

Nach der Amplifikation der Sonde wurde diese nochmals bei 95°C erhitzt und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Damit war sicher gestellt, dass die DNA als Einzelstrang vorliegt, der dann als Sonde komplementär an das gesuchte Genfragment binden kann.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten Parasitenproteine identifiziert werden, die während der Leberphase des Parasiten ins Wirtszellzytoplasma exportiert werden. Deshalb wurde zunächst nach Proteinen gesucht, die ein Pexel-Motiv aufweisen.

3.1 *P. berghei*-Proteine mit Pexel-Motiv

Um zu überprüfen, ob das Pexel-Motiv auch in *P. berghei* und zudem während der Leberphase des Parasiten zum Export in die Wirtszelle führt, wurde zunächst in der *P. berghei*-Datenbank nach entsprechenden Proteinen gesucht. Da es sich um konservierte Proteine handeln sollte, wurden nur solche berücksichtigt, von denen homologe Proteine auch in den *P. falciparum*-Datenbanken existierten. Unter diesen Voraussetzungen wurden nur sehr wenige Kandidaten gefunden. Das weist darauf hin, dass Pexel-Proteine in *P. berghei* nicht eine so entscheidende Rolle spielen, wie es von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten bekannt ist.

Zunächst wurde mit RT-PCR-Analysen überprüft, ob die entsprechenden Kandidatengene auch während der Leberphase exprimiert werden. Schließlich wurden drei Kandidatenproteine identifiziert, die weiter charakterisiert werden sollten. Um zu überprüfen, ob diese Proteine vom Parasiten exportiert werden, mussten spezifische Antikörper gegen die jeweiligen Proteine hergestellt werden. Dazu wurden die Parasitenproteine als Fusionsproteine in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und schließlich zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Nach Bestätigung der Spezifität der Antiseren wurden sie in Immunfluoreszenz-Analysen eingesetzt. Leider konnte weder in infizierten Leberzellen noch in infizierten Blutzellen eine Sezernierung der Proteine festgestellt werden. Obwohl nicht auszuschließen ist, dass andere Proteine mit Pexel-Motiv tatsächlich exportiert werden, scheinen Proteine mit diesem Motiv bei *P. berghei* nicht von großer Bedeutung zu sein.

3. Ergebnisse

Gen-Bezeichnung	Expressionsphasen	Expressions-plasmid	Detektion außerhalb des Parasiten möglich
<i>pb000969.02.0</i>	Blut, Leber, Oozysten	pMalCRI	Nein
<i>pb000639.03.0</i>	Blut, Leber, Oozysten	pMalCRI	Nein
<i>pb108121.00.0</i>	Blut, Leber, Oozysten	pMalCRI	Nein

Tabelle 3.1: Untersuchung des Pexel-Motivs

Da in infizierten HepG2-Zellen keines dieser Proteine außerhalb der Parasitenzelle mit Antikörpern detektiert werden konnte, wurde bei der Auswahl weiterer Gene das Pexel-Motiv nicht mehr berücksichtigt. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nach Proteinen gesucht, die ein klassisches Signalpeptid besitzen und so zumindest in die parasitophore Vakuole (PV) sezerniert werden sollten. Um die Suche unter den vielen hundert Proteinen mit Signalpeptid weiter einzuschränken, waren nur solche interessant, die ausschließlich während der Leberphase des Parasiten exprimiert werden.

3.2 Identifikation Leberphasen-spezifisch exprimierter mRNAs

3.2.1 RT-PCR-Analysen

Sacci Jr. *et al.* (2005) beschreiben 623 verschiedene Gene von *P. yoelii*, die während der Leberphase exprimiert werden. 25% dieser Gene sollen zudem ausschließlich in diesem Stadium exprimiert werden (Sacci *et al.*, 2005). Hiervon wurden 40 Gene mit vorhandener Signalsequenz ausgewählt und mit Hilfe der Datenbanken PlasmoDB und GeneDB die homologen Gene von *P. berghei* identifiziert. Über RT-PCR-Analysen wurde die mRNA-Expression dieser Gene während der Blut-, Oozysten- und Leberphase überprüft. Von den 40 untersuchten Genen wurde eines nur in der Leberphase exprimiert. Die übrigen 39 Gene zeigten überraschenderweise Expression in allen getesteten Entwicklungsphasen des Parasiten. In Abbildung 3.1B sind exemplarisch die Ergebnisse von sechs RT-PCR-Analysen gezeigt.

Das Leberstadien-spezifisch exprimierte *P. berghei*-Gen *pb103464.00.0* ist homolog zum *P. yoelii*-Gen *py05129*. Das Gen *pb103464.00.0* kodiert für ein Protein mit unbekannter Funktion und wird folgend als *pblsa4* (*liver-stage-antigen 4*) bezeichnet.

3. Ergebnisse

Des Weiteren wurde der mRNA-Level von *pblsa4* neben dem konstitutiv exprimierten *pbtubulin* auch mit *pblsa1* (*liver-stage-antigen 1*) verglichen.

Das bereits von *P. falciparum* bekannte *Isa1* wird größtenteils während der Leberphase exprimiert. Für *P. berghei* konnte dieses Gen jedoch zunächst nicht identifiziert werden, da sich die Nukleotidsequenz dieses Gens unter den Plasmodienarten stark unterscheidet. Erst durch die Syntenie-Studie von Kooij *et al.* (2005) konnte auf Grund der Position für *P. yoelii* ein entsprechendes Gen lokalisiert werden. Für *P. berghei* wies dieser Positionsvergleich auf das Gen *pb101911.00.0* hin.

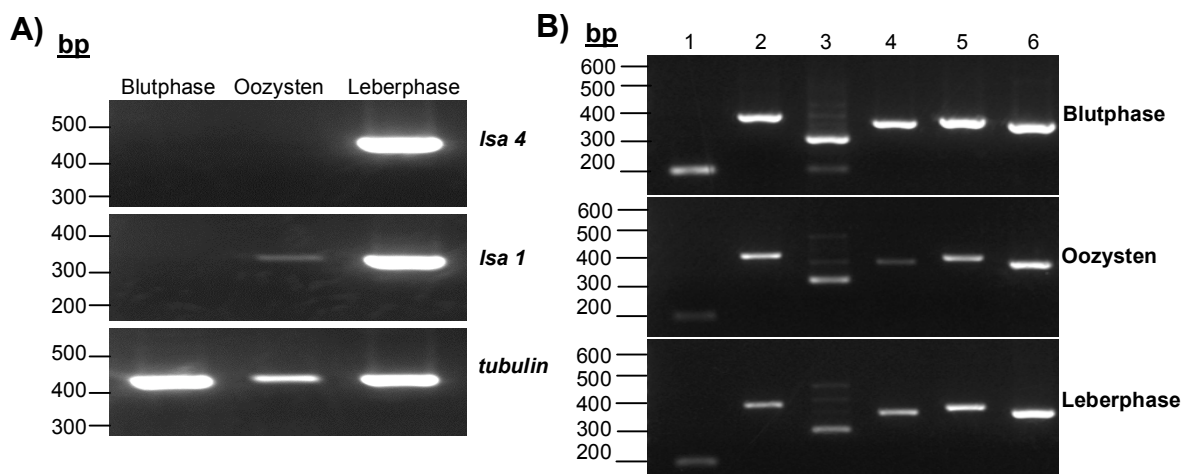


Abb.3.1: Nachweis stadienspezifischer mRNA-Expression des Gens *pblsa4* sowie weiterer Kandidatengene.

A) mRNA-Expression der stadienspezifisch regulierten Gene *pblsa4* und *pblsa1* sowie *pbtubulin*.

Die Gesamt-mRNA wurde aus dem Oozystenstadium sowie der Blut- und Leberphase 48h nach Infektion von *P. berghei* gewonnen und mittels RT-PCR analysiert. Verwendete Primerpaare für den Nachweis von *pblsa4* waren 312/313 (Amplifikatgröße: 465bp); Primerpaar zum Nachweis von *pblsa1* waren 310/311 (Amplifikatgröße: 350bp); Primerpaar zum *pbtubulin*-Nachweis: 66/67 (Amplifikatgröße: 417bp). Eine RT-PCR-Analyse ohne Reverse Transkriptase ergab kein Amplifikationsprodukt.

B) mRNA-Expression von nicht-stadienspezifisch regulierten Genen.

Spur 1:	cDNA des Gens <i>pb001090.02.0</i>	201bp	Primerpaar 347/348
Spur 2:	cDNA des Gens <i>pb000905.02.0</i>	486bp	Primerpaar 349/350
Spur 3:	cDNA des Gens <i>pb001109.00.0</i>	343bp	Primerpaar 351/352
Spur 4:	cDNA des Gens <i>pb106206.00.0</i>	430bp	Primerpaar 353/354
Spur 5:	cDNA des Gens <i>pb000603.02.0</i>	459bp	Primerpaar 355/356
Spur 6:	cDNA des Gens <i>pbtubulin</i> (Kontrolle)	417bp	Primerpaar 66/67

Eine RT-PCR-Analyse ohne Reverse Transkriptase ergab kein Amplifikationsprodukt. Darüber hinaus handelt es sich bei den Primern 349/350 (*pb000905.02.0*) um Intron-übergreifende Primer, deren Amplifikationsprodukt im Falle von genomischer DNA-Kontamination ein 615bp großes Produkt hätten bilden müssen. Jeweils 1%ige Agarosegele mit 0,5µg/ml EtBr.

Während *pblsa4*-mRNA tatsächlich nur während der Leberphase (48h nach Infektion) exprimiert wurde, konnte *pblsa1*-mRNA auch im Oozystenstadium nachgewiesen werden.

Deshalb sollte zunächst nur die mRNA-Expression des *pblsa4*-Gens weiter charakterisiert werden.

3. Ergebnisse

3.2.2 Zeitverlauf der *pblsa4*-mRNA Expression

Um den Zeitverlauf der mRNA-Expression des *pblsa4*-Gens zu überprüfen, wurde mRNA aus infizierten HepG2-Zellen 16h, 25h, 30h, 48h und 60h nach Infektion gewonnen und mittels RT-PCR nachgewiesen.

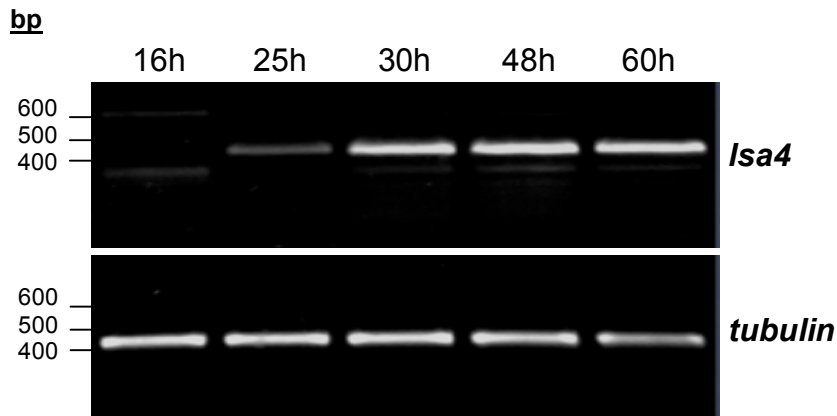


Abb.3.2: Expression der *pblsa4*-mRNA während der Leberphase. mRNA wurde zu den angegebenen Zeiten isoliert und einer RT-PCR-Analyse unterzogen. Zur Amplifikation wurden wiederum die Primerpaare 312/313 (*pblsa4*) und 66/67 (*pbtubulin*) verwendet. Ein Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase ergab für keinen Zeitpunkt ein Amplifikationsprodukt. 1%ige Agarosegele mit 0,5µg/ml EtBr.

Im Vergleich zu *pbtubulin*-mRNA ist *pblsa4*-mRNA erstmals 25h nach Infektion nachweisbar, wird jedoch ab 30h nach Infektion deutlich stärker transkribiert.

Um das Protein PbLSA4 in infizierten Leberzellen durch IF-Analysen nachweisen und lokalisieren zu können, sollten nun entsprechende polyklonale Antiseren hergestellt werden.

3.3 Klonierung des *pblsa4*-Gens in Expressionsplasmide

Um Tiere immunisieren zu können, musste zunächst rekombinantes PbLSA4-Protein hergestellt werden. PbLSA4 sollte als His- und GST-Fusionsprotein in Bakterienzellen synthetisiert werden.

3.3.1 PbLSA4 als GST-Fusionsprotein

Das *pblsa4*-Gen enthält keine Introns und konnte deshalb mittels PCR aus genomischer Blutphasen-DNA amplifiziert werden. Es wurde das Primerpaar 614/671 verwendet, welches zu einem Produkt führt, das das gesamte *pblsa4*-Gen ohne Stopp-Codon umfasst (Abb.3.3A). Die Primer wurden so konstruiert, dass mit

3. Ergebnisse

dem *forward*-Primer eine *Bam*HI- und mit dem *reverse*-Primer eine *Xho*I-Schnittstelle an die Enden des PCR-Produktes amplifiziert wird. Das *pblsa4*-Gen wurde zunächst in den *pGEM-T-Easy*-Vektor subkloniert (Abb.3.3B+D) und dann in das Expressionsplasmid pGEX6P1 umkloniert (Abb.3.3C+E). Die Proteinexpression erfolgte nach Transformation in Bakterienzellen durch Zugabe von IPTG. Anschließend wurden die Bakterienzellen lysiert und die lösliche von der unlöslichen Fraktion getrennt. Es zeigte sich, dass das GST-Fusionsprotein unlöslich war, weshalb eine Reinigung durch Affinitätschromatographie mit Glutathion-Agarose nicht möglich war.

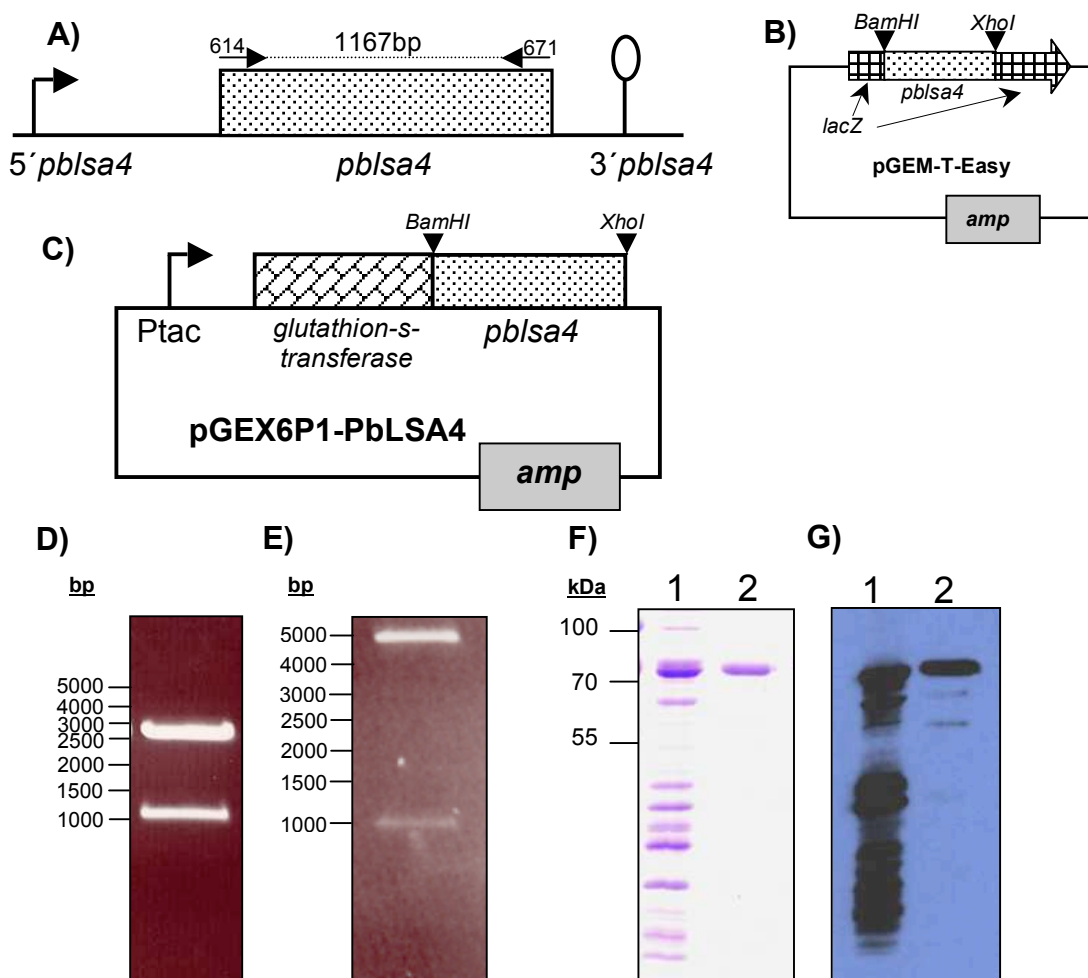


Abb.3.3: Klonierung des *pblsa*-Gens in pGEX6P1 und Expression des GST-PbLSA4-Fusionsproteins.
A) Schematische Darstellung des genomischen *pblsa4*-Locus. **B)** Schematische Darstellung des *pGEM-T-Easy*-Plasmids mit *pblsa4*-Gen. Das mit *amp* bezeichnete Kästchen beschreibt das im Plasmid vorliegende Ampicillin-Resistenz-Gen, mit dessen Hilfe Plasmid-tragende Bakterien identifiziert wurden. **C)** Schematische Darstellung des Expressionsplasmids mit integriertem *pblsa4*. **D)** Kontrollverdau des *pGEM-T-Easy*-Plasmids (2800bp) mit *pblsa4*-Insert (1167bp) durch Endonukleasen *Bam*HI und *Xho*I. **E)** Kontrollverdau des pGEX6P1-Plasmids (4900bp) mit *pblsa4*-Insert (1167bp); beide Agarosegele waren 1%ig und enthielten 0,5µg/ml EtBr. **F)** Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-PAGE-Gel mit der unlöslichen Fraktion vor (1) und nach (2) Reinigung des GST-PbLSA4-Fusionsproteins durch die *PREP-Cell*-Technik. **G)** WB-Analyse mit αPbLSA4-Mausserum (Verdünnung 1:1000) und αMaus HRP-markiert (Verdünnung 1:1500).

3. Ergebnisse

Die unlösliche Fraktion des Bakterienlysats, welches rekombinantes GST-PbLSA4-Fusionsprotein enthielt, wurde deshalb mit Hilfe der *PREP-Cell*-Technik gereinigt (Abb.3.3F). Diese Technik beruht auf einer einfachen Gelelektrophorese und kann deshalb auch für die Reinigung unlöslicher Proteine herangezogen werden. Mit dem gewonnenen Protein wurde eine Maus immunisiert und das Mausserum zunächst in *Western Blot*-Analysen (*WB*-Analysen) gegen das rekombinante Protein getestet (Abb.3.3G).

Die Antikörper aus dem Mausserum detektieren mehrere Proteine in der unlöslichen Fraktion des Bakterienlysats sowie das gereinigte rekombinante PbLSA4-Protein (siehe Abb.3.3G). Das Mausserum enthält demnach Antikörper, die entweder das GST oder das PbLSA4, höchstwahrscheinlich jedoch beides erkennen. Um die Spezifität genauer zu ergründen, wurde ein *pblsa4*-Genfragment in ein His-Expressionsplasmid kloniert.

3.3.2 PbLSA4 als His-Fusionsprotein

Um zu überprüfen, ob das Mausserum spezifische Antikörper gegen das PbLSA4-Protein enthielt, wurde ein zweites Fusionsprotein hergestellt. Dabei sollte ein möglichst hydrophiler Teil des PbLSA4-Proteins als His-Fusionsprotein synthetisiert werden, um die Löslichkeit zu verbessern (Abb.3.4A+B). Dazu wurde ein 533bp großes Fragment mit den Primern 508/507 amplifiziert und mit den Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* in das pJC45-Plasmid (Abb.3.4B) kloniert. Die erfolgreiche Integration des Genfragments wurde durch einen Kontrollverdau mit *EcoRI* und *BamHI* überprüft (Abb.3.4C). Nach Transformation in BL21-*E. coli*-Zellen wurde die Expression des His-Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG ausgelöst und nach Lyse der Bakterienzellen die lösliche Phase von der unlöslichen getrennt. Das His-PbLSA4-Fusionsprotein befand sich in der unlöslichen Fraktion des Bakterienlysats (Abb.3.4D). Es ließ sich unter denaturierenden Bedingungen auf eine Nickel-NTA-Säule binden, konnte aber nicht eluiert werden. Das auf der Säule gebundene Fusionsprotein konnte in Lämmli-Puffer von der Säule getrennt werden und eignete sich dann zum Testen des gewonnenen Mausserums durch *WB*-Analyse (Abb. 3.4E).

3. Ergebnisse

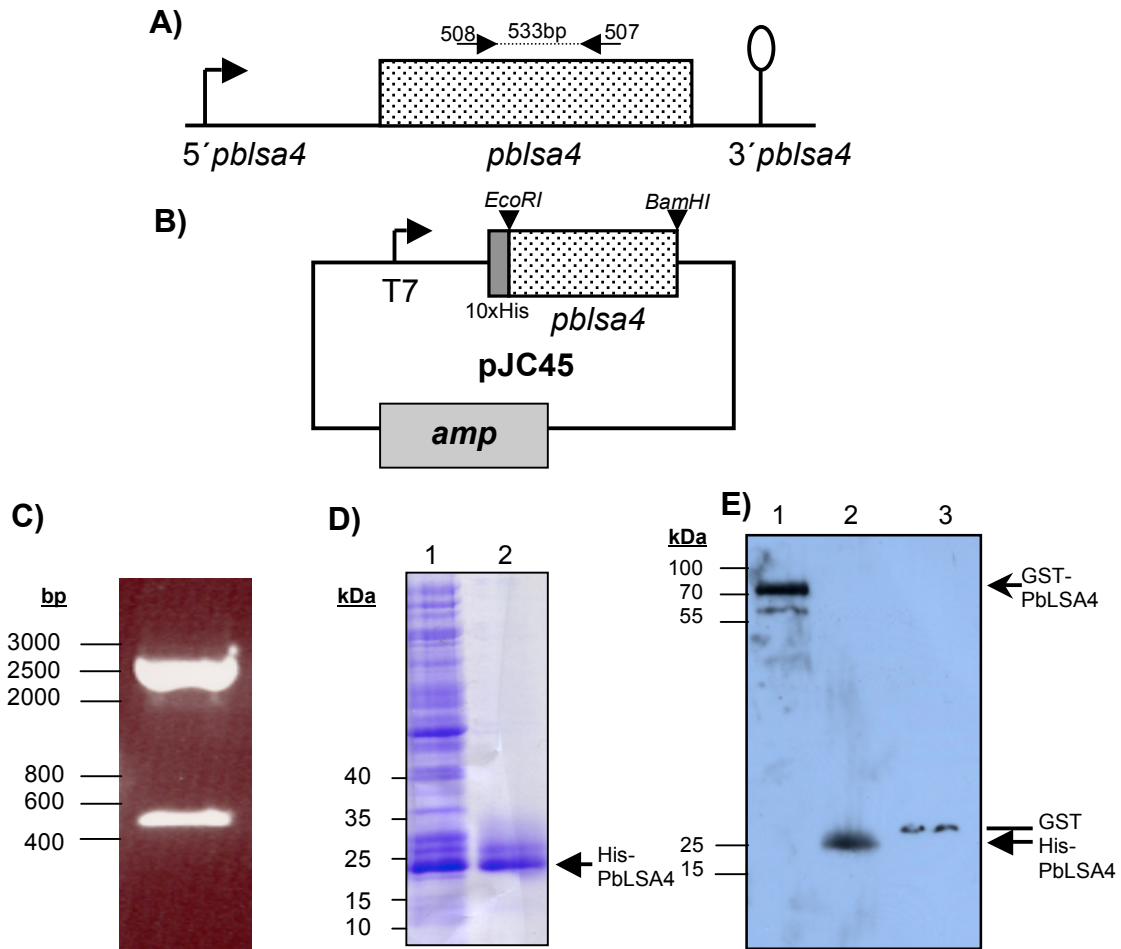


Abb.3.4: Klonierung des His-PbLSA4-Fusionsproteins.

A) Schematische Darstellung des genomischen *pblsa4*-Locus. Das 533bp Fragment stammt aus dem mittleren Teil des Gens. **B)** Schematische Darstellung des pJC45-Plasmids mit *his-pblsa4*-Fusion. **C)** Der Kontrollverdau mit *EcoRI* und *BamHI* zeigt das pJC45-Plasmid (2400bp) und das 533bp *pblsa4*-cDNA-Fragment. **D)** SDS-PAGE-Gel mit rekombinantem Protein vor (1) und nach (2) Reinigung. Das durch den Pfeil markierte Fusionsprotein liegt bei einer Größe von 24kDa. **E)** WB mit α PbLSA4-Mausserum (Verdünnung 1:1000) und α Maus HRP-markiert (Verdünnung 1:1500)

(1) gereinigtes GST-PbLSA4 (72kDa) ←
 (2) His-PbLSA4 (24kDa) und ←
 (3) GST-Protein (26kDa) —

Außer dem GST-PbLSA4-Fusionsprotein wird auch das His-PbLSA4-Fusionsprotein (24kDa) detektiert. In dem Mausserum befinden sich demnach tatsächlich polyklonale Antikörper gegen das PbLSA4-Protein. Daneben existieren auch Antikörper, die gegen Epitope des GST-Proteins gerichtet sind. Diese stören die Versuche mit Plasmodien nicht, da es sich um Antikörper gegen ein nicht homologes Protein aus *Schistosoma japonicum* handelt.

3. Ergebnisse

3.3.3 Immunfluoreszenz-Analysen zur Detektion des PbLSA4-Proteins

Auf Grund der unter 3.3.2 aufgeführten Ergebnisse konnte das spezifische Antiserum für IF-Analysen eingesetzt werden. HepG2-Zellen wurden mit *P. berghei*-Sporozoitien infiziert, 48h nach Infektion fixiert, permeabilisiert und mit dem polyklonalen Antiserum gegen das PbLSA4-Protein inkubiert. Zusätzlich wurde ein polyklonales Antiserum aus Hühnern verwendet, das spezifisch das Protein Exp1 in der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) detektierte.

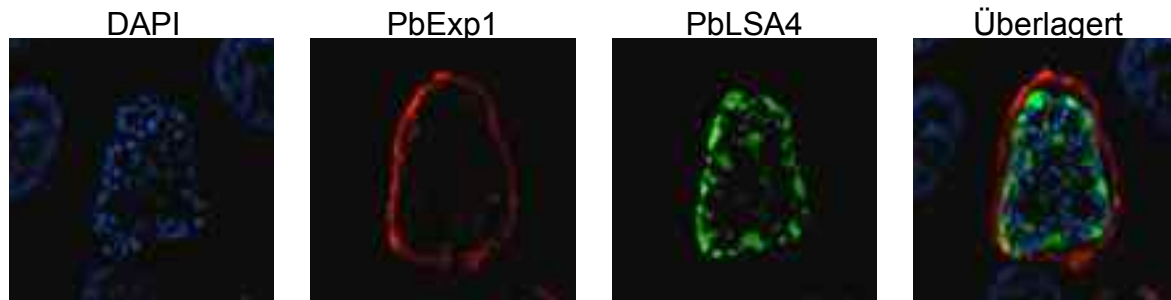


Abb.3.5: Konfokale Lasermikroskopie zur Lokalisation des PbLSA4-Proteins.

P. berghei-infizierte HepG2-Zellen wurden nach 48h fixiert und wie folgt gefärbt: α PbLSA4-Antiserum (Verdünnung 1:500), Zweitantikörper α Maus Alexa 488 (Verdünnung 1:5000). Lokalisation des PbExp1-Proteins durch α Exp1-Antiserum (Verdünnung 1:250), Zweitantikörper α Huhn Alexa 594 (Verdünnung 1:5000). Zellkernfärbung mit DAPI (100 μ g/ml).

Mit dem α -PbLSA4-Antiserum wurden deutlich Bereiche innerhalb der durch PbExp1 sichtbar gemachten PVM angefärbt (Abb.3.5). Da diese jedoch die Grenze zwischen Parasit und Wirtszellzytosol darstellt, muss davon ausgegangen werden, dass das PbLSA4-Protein nicht in das Wirtszellzytosol gelangt. Allerdings deutet die Lokalisation des PbLSA4-Proteins auf einen Transport in die PV oder die Parasiten-Plasmamembran (PPM) hin, was die Funktion der Signalsequenz bestätigt.

Zur weiteren Charakterisierung des PbLSA4-Proteins sollte das dazugehörige Gen teilweise entfernt werden.

3.4 Deletionsmutation des *pblsa4*-Gens

Um das *pblsa4*-Gen zu mutieren, wurde eine Insertions-Strategie angewendet. Bei dieser Methode wird durch die Integration eines Plasmids die vollständige Transkription des betreffenden Gens verhindert. Es wird jedoch der N-terminale Teil des Proteins bis zur Integrationsstelle gebildet. Im Falle einer erfolgreichen Plasmid-Integration in den genomischen *pblsa4*-Locus kommt es zu einer Fusion der ersten

3. Ergebnisse

300 von insgesamt 392 Aminosäuren des PbLSA4-Proteins mit dem auf dem Plasmid kodierten GFP. Falls dieses Fusionsprotein nicht sofort abgebaut wird, sollten erfolgreich transfizierte Parasiten GFP exprimieren und somit grün fluoreszieren.

Die Konstruktion des *pblsa4*-Insertionsplasmids erfolgte nach dem Beispiel der bekannten *P. berghei*-Gene *trap* und *cs* (Nunes et al., 1999).

Transfizierte Parasiten konnten während der Leberphase nun leicht detektiert werden. Sie sollten von solchen Parasiten unterschieden werden, die das Insertions-Plasmid lediglich episomal tragen bzw. es während der Entwicklung in *A. stephensi*-Moskitos wieder aus der Zelle entfernt haben.

Vor der Transfektion war das Plasmid so zu linearisieren, dass es von *pblsa4*-Sequenzen flankiert wird. Dazu musste die ursprünglich nicht im Gen vorhandene Restriktionsschnittstelle *SpeI* durch eine Punktmutation an definierter Stelle durch gerichtete Mutagenese eingeführt werden. In Abb.3.6 ist ein Schema dieser Insertions-Strategie dargestellt.

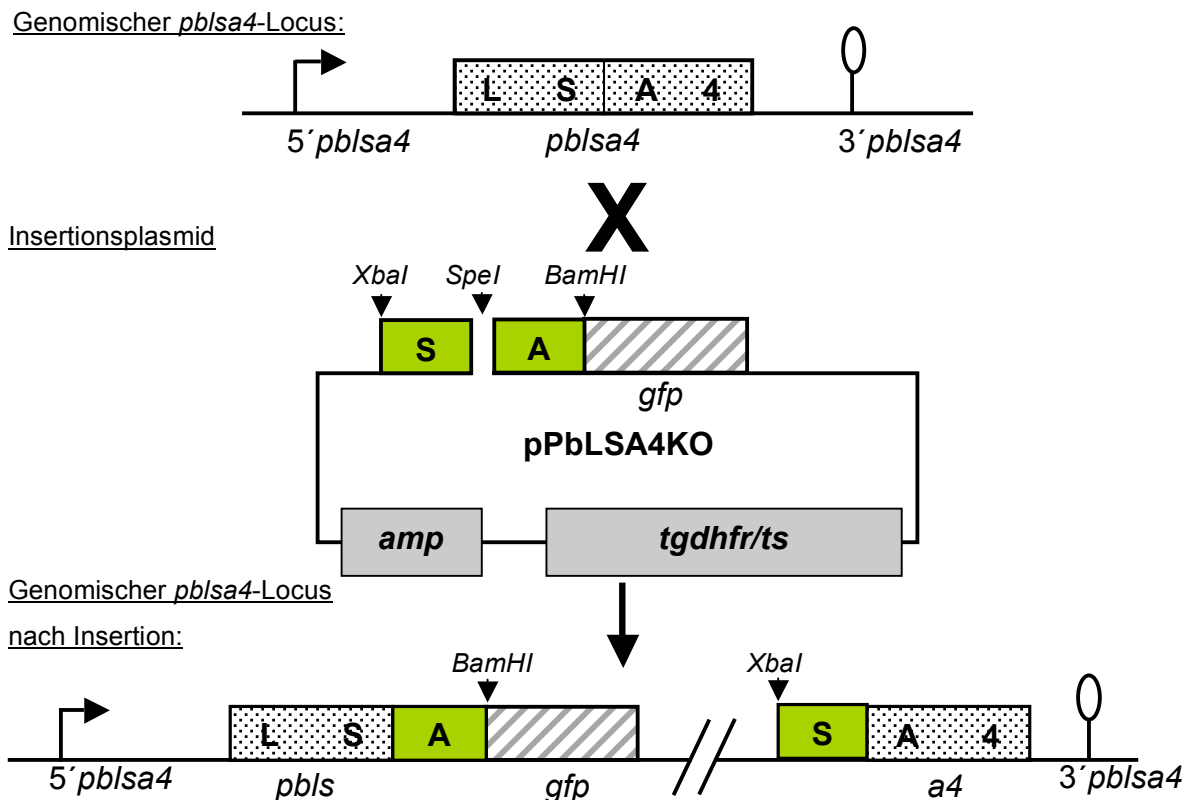


Abb.3.6: Schematische Darstellung der Plasmid-Insertion in den *pblsa4*-Locus.

Ausgangsplasmid für das Insertionsplasmid war der Vektor pL0031 (siehe Abb.2.2). Neben dem Resistenzgen für Ampicillin (*amp*) ist auch das Gen eingezeichnet, das für die Dihydrofolat-Reduktase aus *Toxoplasma gondii* kodiert. Dieses Protein wird von Pyrimethamin nicht gehemmt, daher lassen sich transfizierte Plasmodien damit selektionieren. Das linearisierte Insertionsplasmid pPbLSA4KO wird in den genomischen *pblsa4*-Locus integriert, wodurch die Sequenz des *pblsa4*-Gens unterbrochen wird.

3. Ergebnisse

Nach erfolgreicher Klonierung wurde das Plasmid pPbLSA4KO in *P. berghei*-Schizonten transfiziert, die dazu über einen Gradienten von anderen Blutstadien bzw. von nicht infizierten Blutzellen getrennt wurden. Die Selektion erfolgte in Mäusen, die mit Pyrimethamin behandelt wurden. Die genomische DNA der im Mausblut befindlichen transgenen Parasiten wurde zunächst verwendet, um den korrekten Einbau des linearisierten Plasmids in den *pblsa4*-Locus zu kontrollieren.

3.4.1 Nachweis der Plasmid-Integration mittels PCR

Die korrekte Integration des Plasmids in den *pblsa4*-Locus des Genoms wurde durch eine PCR überprüft. Dazu wurden Primerkombinationen verwendet, bei denen es nur im Falle einer Integration zu einem Amplifikationsprodukt kommt. Als Matrize fungierte jeweils genomische DNA, die aus Blutstadienparasiten gewonnen wurde. Transfizierte Plasmodien wurden mit Wild-Typ (WT)-Parasiten verglichen (Abb.3.7).

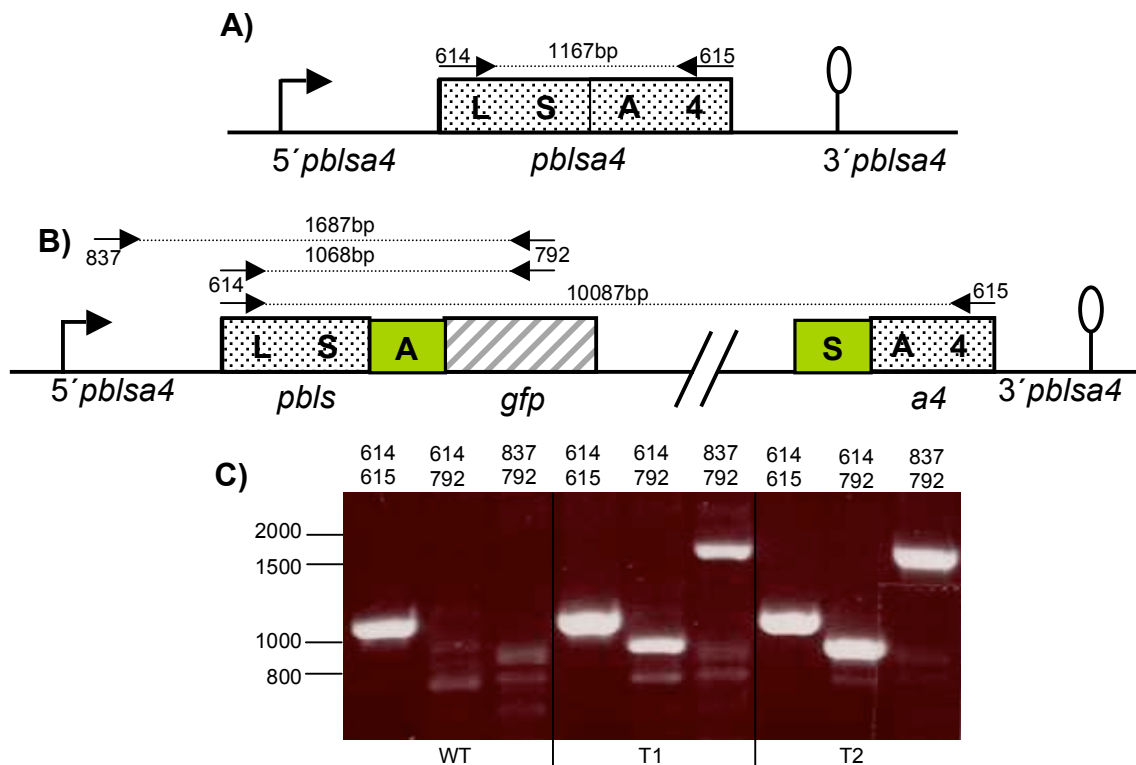


Abb.3.7: Integrationskontrolle mittels PCR.

A) Schematische Darstellung des genomischen *pblsa4*-Gen-Locus ohne Insertion. Eine PCR mit dem Primerpaar 614/615 ergibt ein 1167bp großes Amplifikationsprodukt. **B)** Schematische Darstellung des genomischen *pblsa4*-Locus nach erfolgreicher Insertion des pPbLSA4KO-Plasmids. Eine PCR mit den Primerpaaren 837/792 und 614/792 ergibt ein 1687bp bzw. 1068bp großes Amplifikationsprodukt. Die Primerkombination 614/615 zeigt bei integriertem Plasmid kein Amplifikationsprodukt, da für ein 10087bp großes Amplifikat nicht die entsprechenden PCR-Bedingungen gewählt wurden. **C)** PCR-Ergebnis auf 1%igem Agarosegel mit 0,5µg EtBr. Das 1167bp große Amplifikat, das dem nativen *PbLSA4* entspricht, ist aus jeder der getesteten genomischen DNA zu amplifizieren. Die 1687bp und 1068bp großen Fragmente lassen sich nur bei der genomischen DNAs der transfizierten Parasitenpopulationen T1 und T2 detektieren.

3. Ergebnisse

Mit der Primerkombination 614/615 wird beim WT ein DNA-Fragment der Größe 1167bp amplifiziert. Da dieses Fragment auch bei den Transfektanten zu sehen ist, scheint eine Mischpopulation vorzuliegen, bei welcher neben Parasiten mit der korrekten pPbLSA4KO-Plasmid-Insertion auch Parasiten mit dem WT-*pblsa4*-Gen vorhanden sind. Die Primerkombinationen 614/792 und 837/792 führten nur im Falle einer Integration zu einem Amplifikationsprodukt, da der *forward*-Primer im genomischen *pblsa4*-Gen und der *reverse*-Primer nur innerhalb des *gfp*-Gens im Plasmid binden können. Im Falle der Primer 837/792 liegt der *forward*-Primer in der Promotorregion vor Beginn des *pblsa4*-Gens.

Nachdem über PCR-Analyse bereits auf eine erfolgte Integration geschlossen werden konnte, sollte dieses Ergebnis durch eine *Southern-Blot*-Analyse bestätigt werden. Der Nachweis der Integration mittels PCR erlaubt nämlich keine Aussage über das Verhältnis von Parasiten mit und ohne erfolgter Insertion.

3.4.2 Nachweis der Plasmid-Integration mittels *Southern-Blot*-Analyse

Für den *Southern-Blot* (SB) wurde das gesamte *pblsa4*-Gen als Sonde verwendet (Abb.3.8). Um die genomische DNA in Fragmente zu zerlegen, wurde die Restriktionsendonuklease *Xba*I eingesetzt. Sie schneidet die DNA so, dass im Falle des WT ein 6768bp großes Fragment entsteht, in welchem das *pblsa4*-Gen liegt. Diese Region vergrößert sich deutlich durch die Integration des Plasmids und sollte dann im Falle der Transfektanten T1 und T2 eine Größe von 14.326bp besitzen. Das Plasmid selbst wird mit einer Größe von 9520bp durch die Art der Aufreinigung der genomischen DNA nicht mitgebunden und ist daher in der SB-Analyse nicht nachzuweisen.

Das 1375bp große Fragment, welches bei korrekt integriertem Plasmid erwartet wurde, konnte nicht detektiert werden. Dieser DNA-Bereich wird möglicherweise nicht von der Sonde gebunden. Die SB-Analyse bestätigt, dass bei beiden Ansätzen eine Mischpopulation von Parasiten vorliegt: Neben Parasiten, die das Plasmid korrekt integrierten, sind immer auch Parasiten vorhanden, die das Plasmid als Episom tragen. Durch die SB-Analyse wurde das Verhältnis dieser Mischpopulation deutlich. So lässt sich in Spur 3 (T2) ein erhöhter Anteil an DNA mit korrekt integriertem pPbLSA4KO-Plasmid erkennen.

3. Ergebnisse

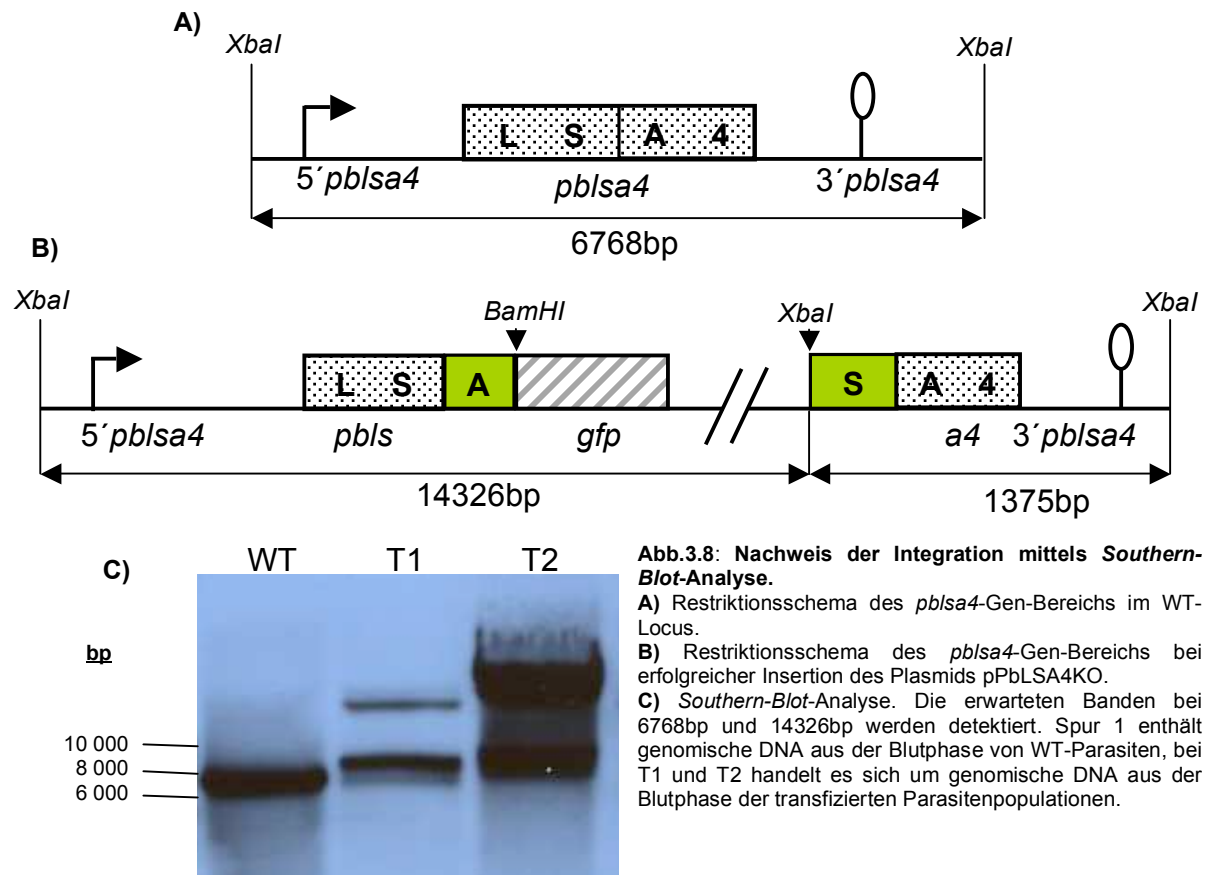


Abb.3.8: Nachweis der Integration mittels Southern-Blot-Analyse.

A) Restriktionsschema des *pbLsa4*-Gen-Bereichs im WT-Locus.

B) Restriktionsschema des *pbLsa4*-Gen-Bereichs bei erfolgreicher Insertion des Plasmids pPbLSA4KO.

C) Southern-Blot-Analyse. Die erwarteten Banden bei 6768 bp und 14326 bp werden detektiert. Spur 1 enthält genomische DNA aus der Blutphase von WT-Parasiten, bei T1 und T2 handelt es sich um genomische DNA aus der Blutphase der transfizierten Parasitenpopulationen.

Um die geänderte PbLSA4-Expression in infizierten HepG2-Zellen nachzuweisen, mussten zunächst *Anopheles*-Mücken infiziert werden. Nach 15-19 Tagen wurden die transgenen Parasiten dann aus den Speicheldrüsen der Mücken isoliert und zur Infektion von HepG2-Zellen verwendet.

3.4.3 Immunfluoreszenz-Analysen der Parasiten mit Insertion im *pbLsa4*-Gen

30h nach HepG2-Infektion konnten GFP-exprimierende Parasiten nachgewiesen werden (vergl. Abb.3.2). Durch Färbung mit den polyklonalen Antikörpern α LSA4 und α GFP konnte die bereits erwartete Mischpopulation sowie eine Ko-Lokalisation mit GFP gezeigt werden (Abb.3.9).

Zwischen 30hpi und 65hpi waren stets GFP-exprimierende Parasiten detektierbar, daher kann bei der gewählten KO-Strategie eine letale Wirkung ausgeschlossen werden. Dennoch waren auffällig wenig GFP-Parasiten in späteren Phasen zu finden. Besonders interessant ist außerdem die Lokalisation des GFP sowie des PbLSA4 im Bereich der Wirtszelle bei seit 65h infizierten Zellen. Zu diesem Zeitpunkt

3. Ergebnisse

löst sich die PVM auf und in der PV vorliegende Proteine treten in das Wirtszellzytosol ein. Auf den Bildern ist deutlich zu erkennen, dass sowohl GFP als auch das PbLSA4-Protein im Wirtszellzytosol vorliegen und sich folglich im Lumen der PV befunden haben müssen.

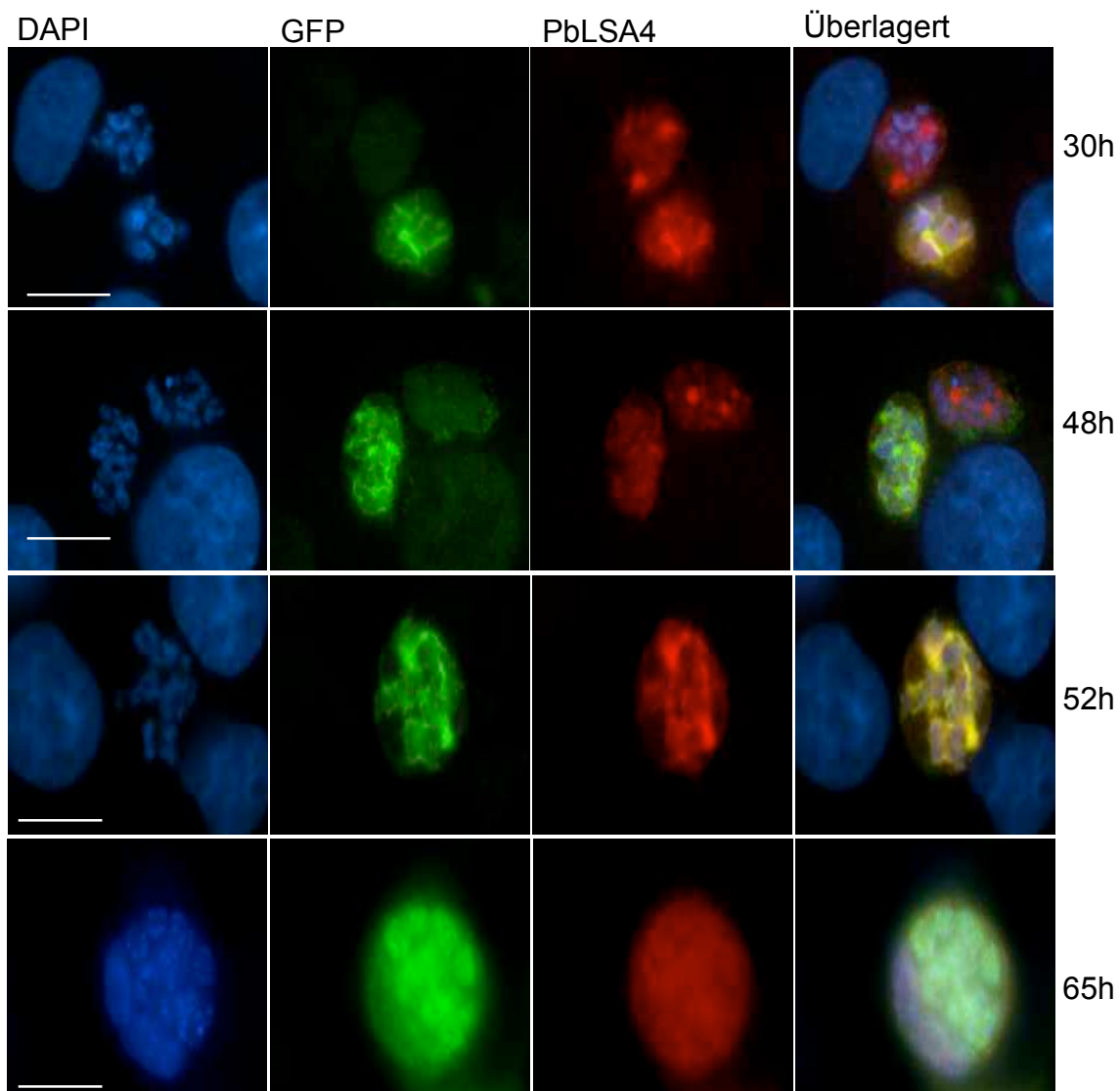


Abb.3.9: IF-Analysen der KO-Parasiten in infizierten HepG2-Zellen 30-65hpi. Proteindetektion mit α GFP-Antikörpern aus Kaninchenserum (Verdünnung 1:1000) und α PbLSA4-Antikörpern aus Mausserum (Verdünnung 1:500). Zweitantikörper: α Kaninchen Cy2 (Verdünnung 1:1000) und α Maus Alexa 594 (1:5000). Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (100 μ g/ml). Größen-Balken entspricht 10 μ m.

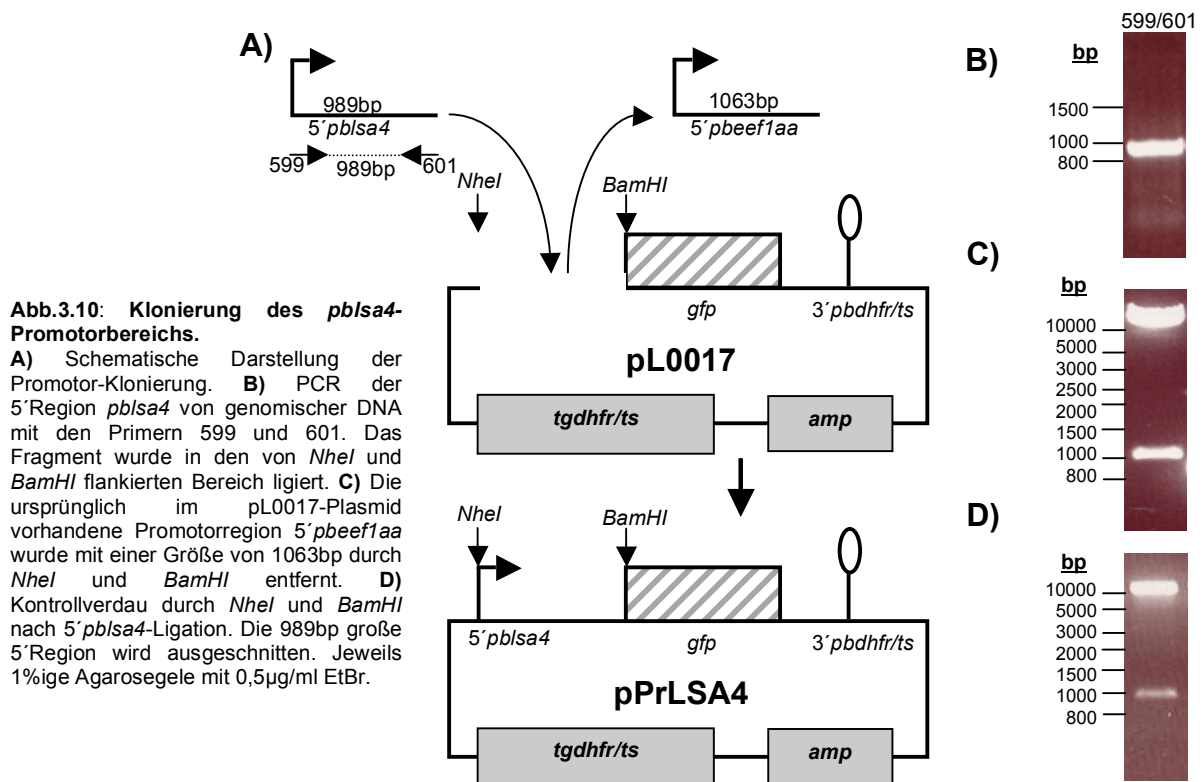
Falls die Plasmid-Insertion in das *pblsa4*-Gen letal für *P. berghei* gewesen wäre, hätten die entsprechenden Parasiten als attenuierte Lebendvaccine benutzt werden können. Da die Insertion jedoch keine deutliche Attenuierung des Parasiten zeigte, sollte als Alternative ein für Plasmodien toxisches Protein unter der Kontrolle des Leberphasen-spezifischen *pblsa4*-Promotors exprimiert werden. Die RT-PCR-Ergebnisse lieferten bereits den Hinweis, dass es sich um einen Promotor handelt,

3. Ergebnisse

der offenbar in der späten Leberphase aktiviert wird (vergl. Abb.3.2). Um diese Ergebnisse weiter zu überprüfen, sollte die Promotor-Region des Gens *pblsa4* vor das *gfp*-Gen kloniert werden. Durch den GFP-Nachweis lässt sich dann auf die Promotoraktivität schließen.

3.5 Charakterisierung der Promotorregion des *pblsa4*-Gens

Zur Verifizierung der potentiellen Leberphasen-Spezifität des PbLSA4-Proteins wurde die Promotorregion des *pblsa4*-Gens so in das Plasmid pL0017 kloniert, dass dieser Bereich als Promotor für das *gfp*-Gen fungieren kann (Abb.3.10A). Diese 5'Region umfasste den gesamten Bereich bis zu dem vor *pblsa4* liegenden Gen. Der ursprünglich im pL0017 vorhandene konstitutiv-aktive Promotor (des Gens *pbee1aa*) wurde dazu aus dem Plasmid entfernt (Abb.3.10C). Danach wurde der 5'Bereich von *pblsa4* (PCR Abb.3.10B) in das Plasmid ligiert und in Bakterienzellen angereichert. Ein Kontrollverdau mit *NheI* und *BamHI* bestätigte die korrekte Klonierung (Abb.3.10D).



3. Ergebnisse

Nach erfolgter Transfektion des neu generierten pPrLSA4-Plasmids in *P. berghei*-Schizonten, erfolgte zunächst die Selektion in Mäusen sowie die Infektion der Mücken. Nach Isolation der Sporozoiten aus den Speicheldrüsen der Moskitos wurden HepG2-Zellen infiziert. Anschließend wurde die GFP-Expression während des gesamten Lebenszyklus von *P. berghei* überprüft. In allen Entwicklungsphasen wurden Parasiten miteinander verglichen, die entweder mit dem pPrLSA4-Konstrukt oder dem ursprünglichen pL0017-Plasmid transfiziert waren, bei dem GFP konstitutiv exprimiert wird.

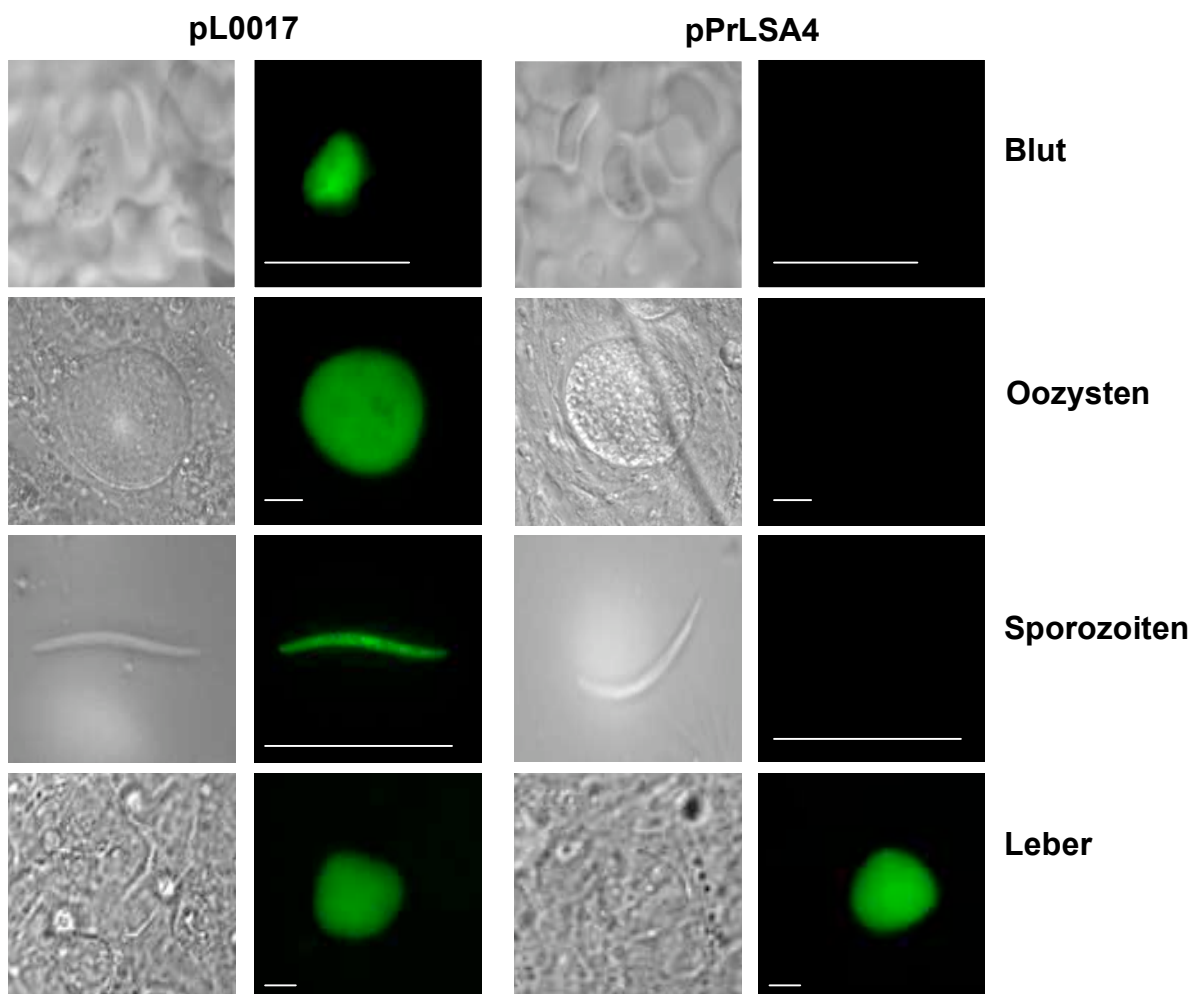


Abb.3.11: Vergleich der Promotoraktivität der 5'Region *pbee1aa* und der 5'Region *pb/sa4* während der Blut-, Oozysten-, Sporozoiten- und Leberphase. Während die 5'Region *pbee1aa* zu einer konstitutiven GFP-Expression führt, ist die 5'Region *pb/sa4* nur in der Leberphase und dort erst nach 30h aktiv. Größen-Balken entspricht 10µm.

Während in den mit dem pL0017-Plasmid transfizierten Parasiten in allen Phasen GFP nachweisbar war, zeigten die mit dem pPrLSA4-Plasmid transfizierten Parasiten nur in der Leberphase GFP-Expression.

In Übereinstimmung mit den RT-PCR-Ergebnissen (siehe Abb.3.2) war innerhalb der ersten 24h nach Infektion der Leberzellen mit den pPrLSA4-Parasiten kein GFP zu

3. Ergebnisse

detektieren. 30h nach Infektion war die Fluoreszenzstärke jedoch mit jener der *pL0017*-Parasiten vergleichbar und blieb in den HepG2-Zellen während der gesamten Entwicklungsdauer stabil. Nachdem der 5' Bereich des *pblsa4*-Gens als Leberphasen-spezifisch identifiziert wurde, sollte die Promotorsequenz näher bestimmt werden. Anhand dieser als Minimalpromotor bezeichneten Sequenz könnte dann wiederum in Datenbanken nach weiteren Leberphasen-spezifisch exprimierten Genen gesucht werden.

3.5.1 Eingrenzung der Promotorregion

Zunächst sollte die Promotorregion vom 5' Ende her verkleinert werden. Dazu wurden jeweils kürzere Fragmente (70-700bp) der Promotorregion in den Trans-

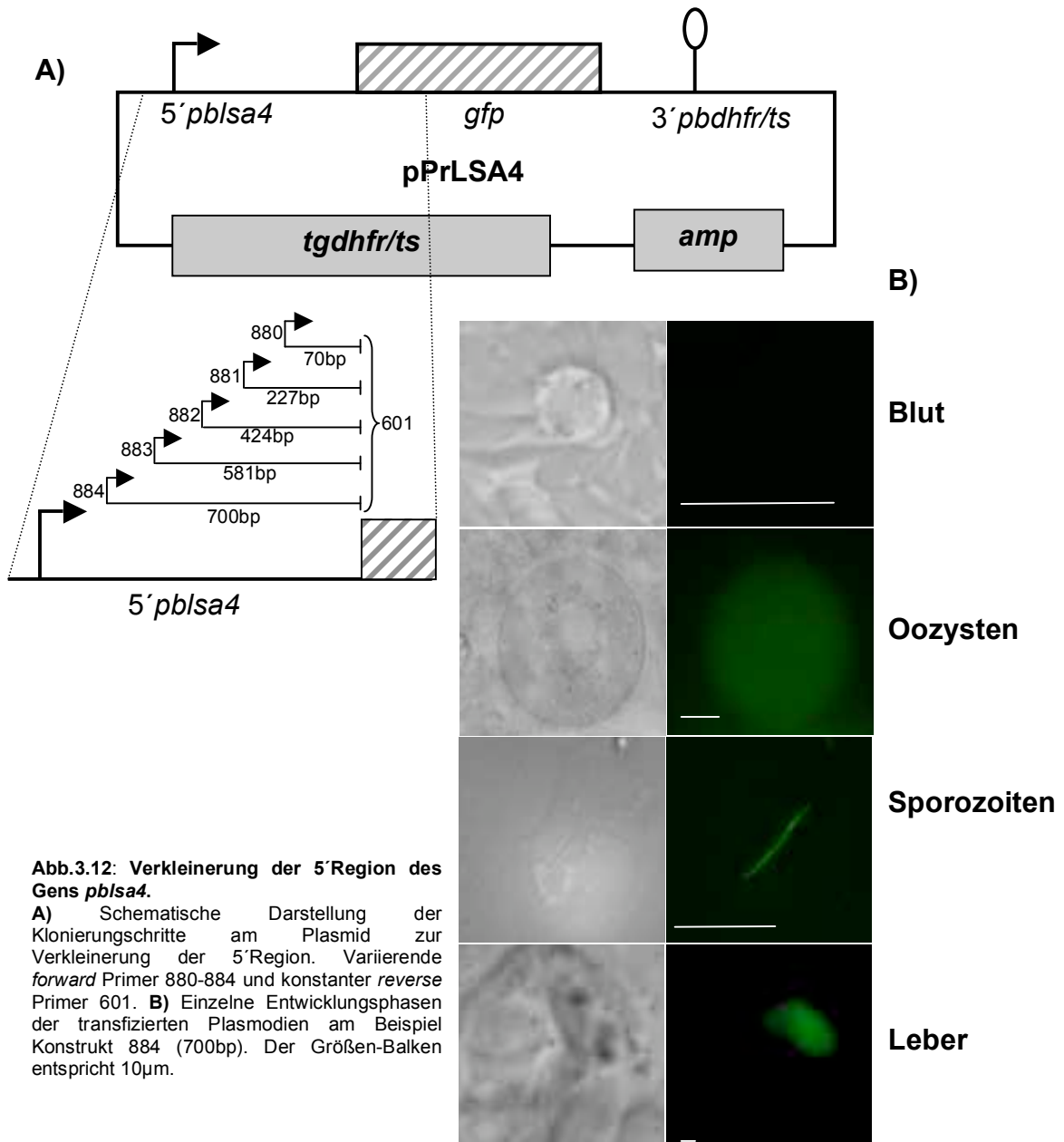


Abb.3.12: Verkleinerung der 5'Region des Gens *pblsa4*.

A) Schematische Darstellung der Klonierungsschritte am Plasmid zur Verkleinerung der 5'Region. Variierende *forward* Primer 880-884 und konstanter *reverse* Primer 601. **B)** Einzelne Entwicklungsphasen der transfizierten Plasmodien am Beispiel Konstrukt 884 (700bp). Der Größen-Balken entspricht 10µm.

3. Ergebnisse

fektionsvektor kloniert und überprüft, ob damit die Promotoraktivität eingeschränkt wurde. Die Fragmentgrößen ergaben sich aus der jeweiligen Primerkombination. Bei jeder Klonierung wurde der gleiche *reverse*-Primer verwendet und nur der *forward*-Primer variiert. Dadurch erfolgte die Verkürzung der 5'Region.

Die 70bp große 5'Region wies keine Promotoraktivität mehr auf (Daten nicht gezeigt). Bei allen anderen Fragmenten zeigte die Kontrolle der einzelnen Entwicklungsphasen des Parasiten eine schwache GFP-Expression während der Oozysten- und Sporozoitenphase. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die GFP-Expression in der Leberphase im Vergleich zur gesamten 5'Region des Gens *pblsa4* reduziert ist.

Die Verkürzung der 5'Region bewirkte also einen Verlust der Leberphasen-Spezifität, so dass für weiterführende Experimente stets die vollständige 5'Region von *pblsa4* verwendet wurde. Möglicherweise wurde bei der Verkürzung der 5'Region ein Sequenzabschnitt eliminiert, an den ein spezifischer Repressor bindet, der nur während der Leberphase abwesend ist. Zusätzlich verliert der Promotor während der Leberphase seinen verstärkenden Effekt, so dass GFP schwächer exprimiert wird als bei vollständigem 5'Bereich.

3.6 Expression des PbLSA4-GFP-Fusionsproteins

IF-Analysen mit α PbLSA4-Antikörpern ließen vermuten, dass PbLSA4 zur Parasitenmembran in die PV transportiert wird. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sollten PbLSA4-GFP exprimierende Parasiten hergestellt werden.

Für die Klonierung wurde das Gen *pblsa4*, welches durch PCR aus dem *pGEM-T-Easy*-Plasmid (siehe Abb.3.3B) amplifiziert wurde, ohne Stopp-Codon in das Plasmid pPrLSA4 eingefügt. Die Klonierung des pPrLSA4-Plasmids ist in Abschnitt 3.5 beschrieben. Da zwischen der 5'Region des *pblsa4*-Gens und dem *gfp*-Gen nur eine *BamHI*-Schnittstelle liegt, war nach der Klonierung eine Kontrolle über die korrekte Orientierung des *pblsa4*-Gens notwendig. Dieser Nachweis erfolgte durch PCR-Analysen (Abb.3.13B). Ein Kontroll-Verdau mit *BamHI* bestätigte darüber hinaus die Integration (Abb.3.13C). Nach erfolgreicher Klonierung wurde das Plasmid pPbLSA4GFP in *P. berghei*-Schizonten transfiziert und mit Pyrimethamin

3. Ergebnisse

selektioniert. Nach erfolgter Infektion der Mücken wurden schließlich HepG2-Zellen infiziert.

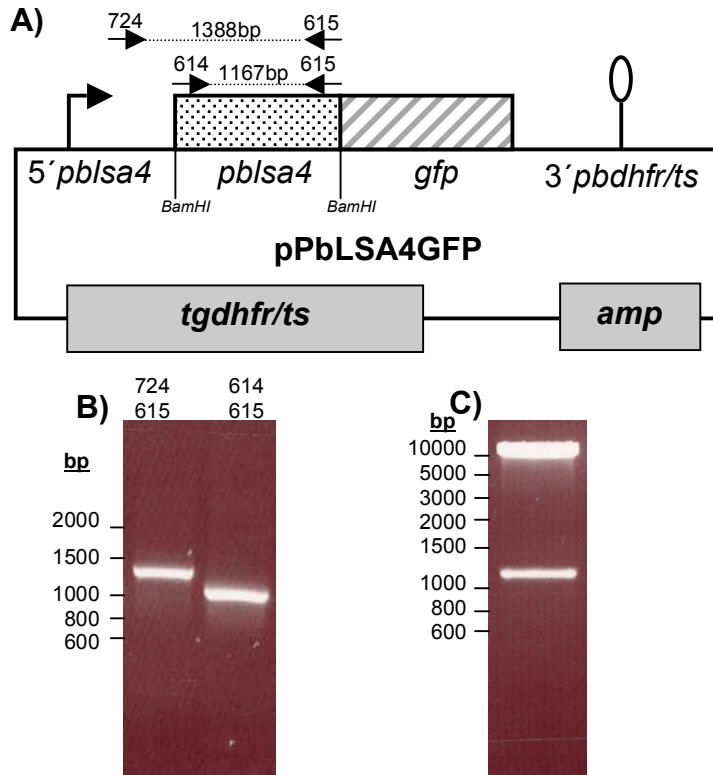


Abb.3.13: Klonierung des pPbLSA4GFP-Plasmids.
A) Plasmidschema pPbLSA4GFP mit Primer-Positionen. **B)** PCR zur Kontrolle der korrekten Insertion des *pblsa4*-Gens. **C)** Kontrollverdau des pPbLSA4GFP-Plasmids mit *Bam*HI; der für *pblsa4* kodierende Bereich (1167bp) wird ausgeschnitten.

Um die Lokalisation des Fusionsproteins festzustellen, wurden IF-Analysen durchgeführt. Neben einem α -GFP-Antiserum wurde ein Serum gegen PbExp1 eingesetzt, um die PVM zu markieren. Als Kontrolle wurden auch Parasiten gefärbt, die mit dem pPrLSA4-Plasmid transfiziert waren. Bei diesem Parasitenstamm wird GFP zwar unter der Kontrolle des *pblsa4*-Promotors exprimiert, es liegt jedoch nicht

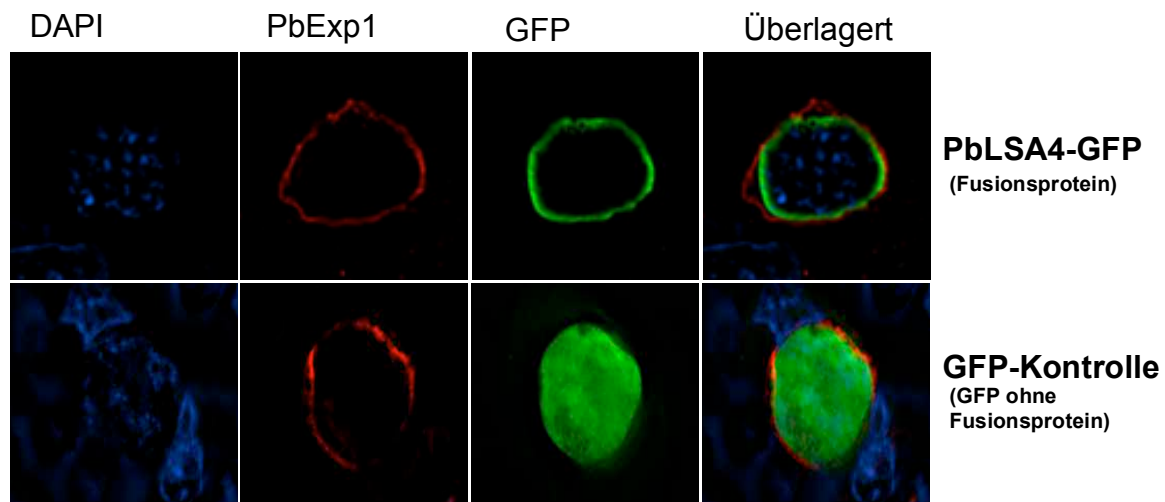


Abb.3.14: Lokalisation des Fusionsproteins PbLSA4-GFP im Vergleich zu zytosolischem GFP.
 Die konfokalen Aufnahmen zeigen HepG2-Zellen 48hpi. Färbung mit α GFP-Antiserum aus Kaninchen (Verdünnung 1:1000) und α PbExp1-Antiserum aus Huhn (1:250). Zweitantikörper α Kaninchen Cy2 (Verdünnung 1:1000) und α Huhn Alexa 594 (Verdünnung 1:5000). Zellkernfärbung mit DAPI (100 μ g/ml).

3. Ergebnisse

als Fusionsprotein vor. Unfusioniertes GFP besitzt kein Signalpeptid und wird deshalb im Parasitenzytosol gefunden.

Das gefärbte PbLSA4-GFP-Fusionsprotein ist in unmittelbarer Nähe zur PVM zu finden und markiert wahrscheinlich die PV oder die Parasitenmembran. Das Ergebnis entspricht damit weitgehend den IF-Analysen in Abb.3.5.

Bei den IF-Färbungen der pPrLSA4-Kontroll-Parasiten ist diese ringförmige Struktur nicht zu sehen. Das GFP-Protein liegt hier gleichmäßig verteilt im Zytoplasma der Parasiten-Zelle vor.

Um zu bestätigen, dass das PbLSA4-GFP-Fusionsprotein die gleiche Lokalisation wie das endogene PbLSA4-Protein hat, wurden weitere IF-Analysen mit pPbLSA4-transfizierten Parasiten durchgeführt.

3.6.1 Das PbLSA4-GFP-Fusionsprotein ko-lokalisiert mit dem endogenen PbLSA4-Protein

HepG2-Zellen wurden mit transgenen Plasmodien, die das Plasmid pPbLSA4GFP tragen, infiziert und nach 48h fixiert. Danach wurden sie mit polyklonalen Antiseren gegen GFP bzw. gegen das PbLSA4-Protein behandelt und mit den entsprechenden Zweitantikörpern gefärbt.

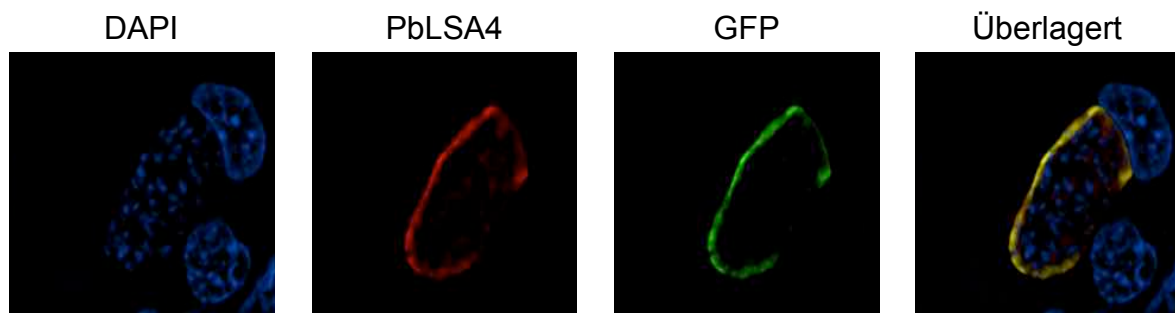


Abb.3.15: Konfokale Lasermikroskopie zur Kontrolle des PbLSA4-GFP-Fusionsproteins.

Lokalisation des GFP-Proteins durch α GFP-Antiserum aus Kaninchen (1:1000) und des PbLSA4-Proteins durch α PbLSA4-Antiserum aus Maus (1:500). Zweitantikörper: α Kaninchen Cy2 (1:1000) und α Maus Alexa 594 (1:5000). Zellkernfärbung mit DAPI (100 μ g/ml). Plasmid pPbLSA4-GFP.

Auch in diesen IF-Analysen fällt die ringförmige Anordnung sowohl des GFP als auch des Proteins PbLSA4 auf. Die intensive Gelbfärbung im überlagerten Bild lässt auf die erwartete Ko-Lokalisation schließen. Sie zeigt außerdem, dass das α PbLSA4-Serum tatsächlich spezifisch das PbLSA4-Protein erkennt.

3. Ergebnisse

Die angefertigten IF-Analysen und die Tatsache, dass ein Signalpeptid in der Proteinstruktur vorliegt, deuten auf eine Sezernierung des PbLSA4-Proteins hin. Es konnte aber nicht abschließend geklärt werden, ob das Protein im Lumen der PV oder auf der PPM lokalisiert ist. Eine Sezernierung in die PVM und in das Wirtszellzytosol kann ausgeschlossen werden. Damit ist allerdings auch unwahrscheinlich, dass dieses Protein Einfluss auf die Signaltransduktion der Wirtszelle hat.

Durch die Insertions-Strategie sollte überprüft werden, ob der Parasit bei eingeschränkter PbLSA4-Funktion geschwächt wird bzw. die Wirkung letal ist. Damit wäre dieser Parasitenstamm als attenuierte Lebendvaccine in Frage gekommen. Da der Parasit bei der gewählten Strategie keine Anzeichen von einsetzendem Zelltod aufwies, sollte als Alternative ein für Plasmodien toxisches Protein unter der Kontrolle des Leberphasen-spezifischen Promotors exprimiert werden.

Da Listeriolysin (LLO) bereits erfolgreich in Versuchen mit Mykobakterien eingesetzt wurde (Grode et al., 2005), sollten LLO-exprimierende Parasiten generiert werden.

Alle Klonierungen mit Listeriolysin erfolgten mit einem mutierten *hlyA*-Gen (*hlyA* = HämolyisinA = LLO). Dieses Gen kodiert für ein LLO-Protein, bei dem die Aminosäure Leucin an Position 461 durch Threonin ersetzt wurde. Dieser Austausch einer einzigen Aminosäure führt dazu, dass das pH-Optimum dieses Proteins vom sauren in den neutralen Bereich verschoben ist (Glomski et al., 2002).

3.7 Expression von Listeriolysin unter der Kontrolle des *pblsa4*-Promotors

Listeriolysin ist ein Poren-bildendes Protein, das in Membranen integriert wird und sie damit auch für hochmolekulare Moleküle durchlässig macht.

Ziel war es, durch Listeriolysin-Expression entweder die PPM, die PVM oder die Wirtszellmembran zu zerstören. Alle Ansätze sollten der Eliminierung des Parasiten dienen und zu einer starken Immunantwort führen. Zunächst sollte das Listeriolysin so exprimiert werden, dass die PPM zerstört wird.

Im Plasmid pPrLSA4 wird das *gfp*-Gen von der Leberphasen-spezifischen 5'Region des *pblsa4*-Gens kontrolliert. Das *gfp*-Gen in diesem Plasmid wurde durch das *hlyA*-

3. Ergebnisse

Gen, das für LLO kodiert, ausgetauscht (Abb.3.16). Dabei wurden die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xba*I verwendet. Das Primerpaar 703/704 zur Amplifikation des *hlyA*-Gens wurde dabei so konstruiert, dass die bakterielle Signalsequenz nicht amplifiziert wird. Das *hlyA*-Gen- enthaltende Plasmid pJH326 wurde für die PCR als *template* genutzt und musste danach durch Gelaufreinigung von dem Amplifikationsprodukt getrennt werden (vergl. Abb.3.16B).

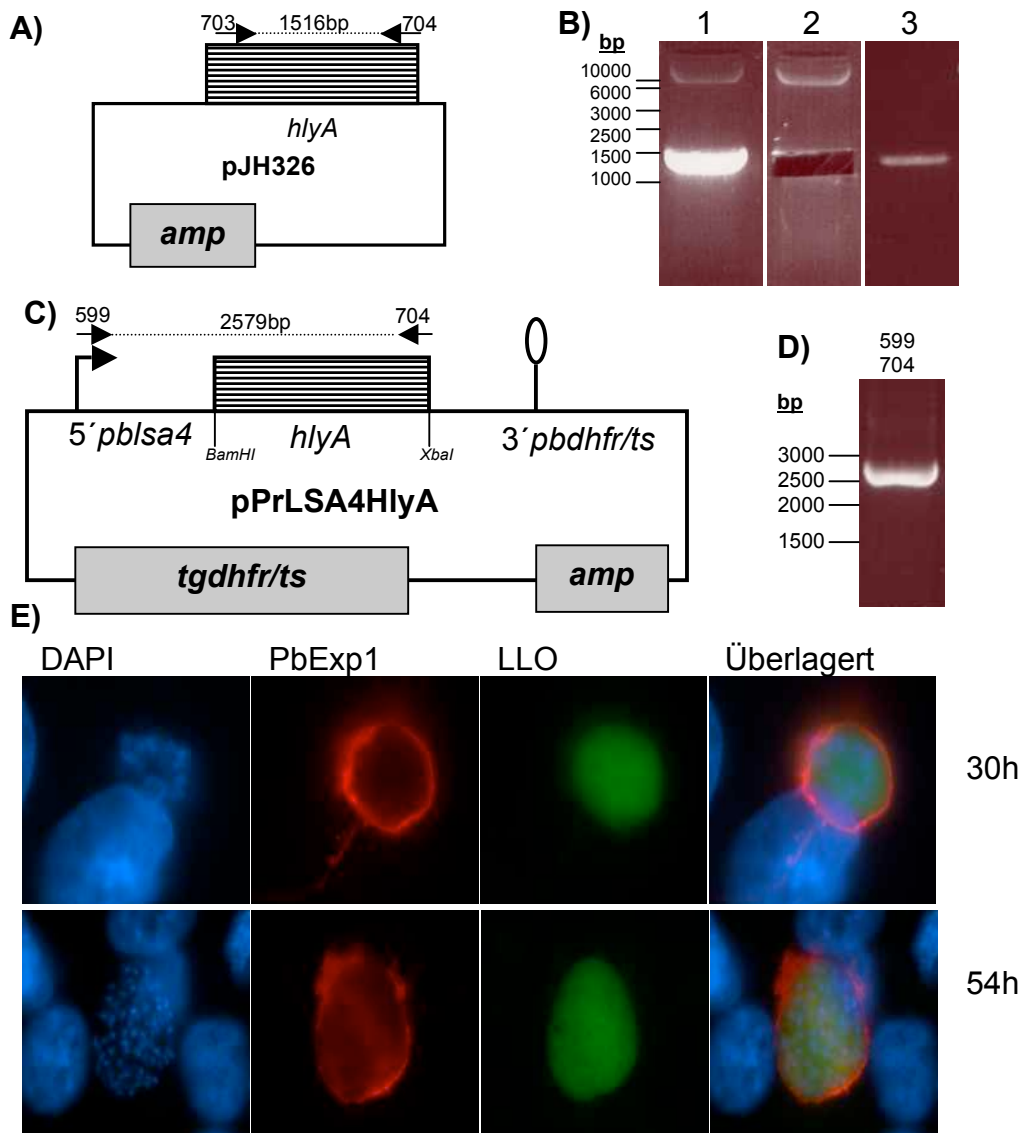


Abb.3.16: *hlyA* unter der Kontrolle des *pblsa4*-Promotors.

A) Schematische Darstellung des pJH326-Plasmids **B)** Ergebnis der PCR mit pJH326 *template*. Es wurden die Primer 703 und 704 zur Amplifikation des *hlyA*-Gens benutzt (1), das Amplifikationsprodukt wurde aus dem 1%igen Agarosegel mit 0,5µg/ml EtBr ausgeschnitten (2) und lag schließlich vom Plasmid getrennt vor (3) **C)** Schematische Darstellung des pPrLSA4HlyA-Plasmids mit Primerbindepositionen. **D)** Nachweis der korrekten Integration mittels PCR mit den Primern 599 und 704. (1%iges Agarosegel mit 0,5µg/ml EtBr.) **E)** IF-Analysen der transfizierten Parasiten in HepG2-Zellen 30h und 54h nach Infektion. Lokalisation des LLO durch αLLO Mauserum (Verdünnung 1:250); Zweitantikörper αMaus Alexa 488 (Verdünnung 1:5000) im Vergleich zur PVM, die nach Behandlung mit αPbExp1-Antikörper (Verdünnung 1:250); Zweitantikörper αHuhn Alexa 594 (Verdünnung 1:5000) sichtbar gemacht wurde. Zellkernfärbung mit DAPI (100µg/ml).

3. Ergebnisse

Nach der Transfektion und der anschließenden Mücken-Passage wurden HepG2-Zellen mit den transgenen Sporozoiten infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten für IF-Analysen fixiert.

Mit spezifischen Antisera ließ sich Listeriolysin im Zytosol des Parasiten überzeugend nachweisen. Eine Attenuierung des Parasiten war nicht zu beobachten, da sich auch bei späten Entwicklungsstadien LLO-exprimierende Parasiten zeigten. Jedoch waren insgesamt auffallend wenig infizierte HepG2-Zellen LLO-positiv.

Als nächstes sollte versucht werden, das Listeriolysin gezielt zur PPM bzw. PVM zu transportieren, um eine Porenbildung in diesen Membranen zu erreichen.

Da gezeigt werden konnte, dass sich das PbLSA4-Protein an der PPM befindet, sollte ein PbLSA4-LLO-Fusionsprotein hergestellt werden.

3.7.1 Expression von Listeriolysin als PbLSA4-Fusionsprotein

Zur Klonierung wurde das Plasmid pPrLSA4HlyA verwendet, wobei das für PbLSA4 kodierende Gen zwischen die Promotorregion und Listeriolysin integriert wurde. Für die Klonierung stand bei diesem Konstrukt nur die *Bam*HI-Schnittstelle zur Verfügung (Abb.3.16C). Deshalb wurde als Nachweis für eine korrekte Integration eine PCR durchgeführt, deren *forward*-Primer (599) am 5'Ende des *pblsa4*-Gens und der *reverse*-Primer (704) am 3'Ende des *hlyA*-Gens bindet (Abb.3.17B). Nachdem das Plasmid durch PCR- und Restriktionsanalyse kontrolliert und darüber hinaus sequenziert wurde, konnte die Transfektion von *P. berghei*-Schizonten durchgeführt werden. Auch hier wurden nach der Mücken-Passage und der Infektion von HepG2-Zellen unterschiedliche Zeitpunkte der Leberphase durch IF-Analysen untersucht.

Parasiten, die das PbLSA4-LLO-Fusionsprotein exprimierten, zeigten tatsächlich eine andere Lokalisation des LLO als Parasiten, die dieses Protein ohne Fusionsteil exprimierten. So ließen sich 48hpi vesikuläre LLO-Strukturen im Parasitenzytosol erkennen. Außerdem war PbExp1 in der Parasitenzelle zu detektieren, was einen Hinweis auf eine Fragmentierung der PVM darstellen könnte. Zusätzlich schienen geringe Mengen an LLO in die Wirtszelle gelangt zu sein, da LLO deutlich außerhalb der PbExp1-Färbung detektiert wurde.

3. Ergebnisse

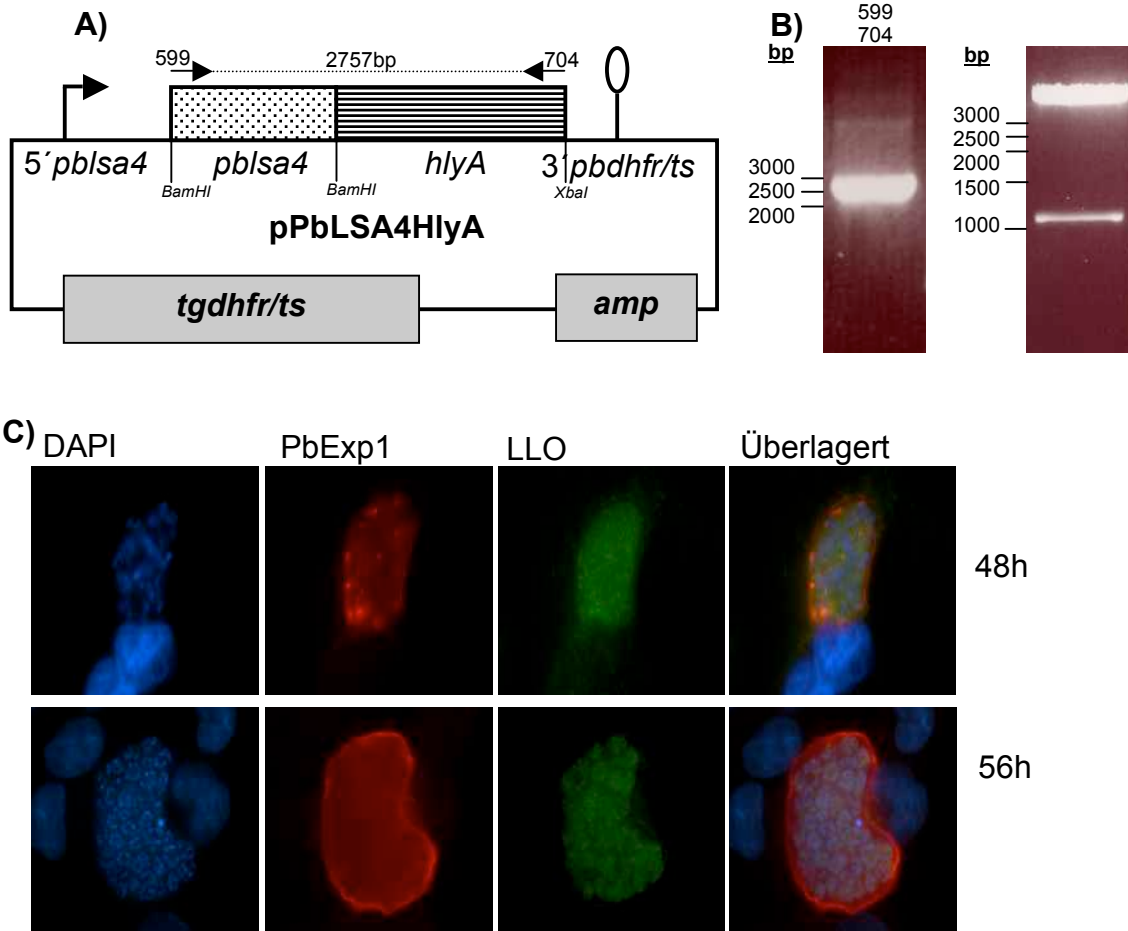


Abb.3.17: Expression des PbLSA4-LLO-Fusionsproteins.

A) Schematische Darstellung des pPbLSA4HlyA-Plasmids mit Primerbindestellen für den Nachweis der Integration **B)** links: Die Integrationskontrolle durch PCR ergibt das in A) dargestellte Amplifikationsprodukt. rechts: Kontrollverdau mit *Bam*HI nach Klonierung. Das *pblsa4*-Gen in einer Größe von 1167bp wird herausgeschnitten. **C)** IF-Analysen der mit pPbLSA4HlyA transfizierten Parasiten in infizierten HepG2-Zellen 48h und 56hpi mit Antiseren aus Huhn (PbExp1) und Maus (LLO) jeweils in der Verdünnung 1:250. Die Zweitantikörper α Huhn Alexa 488 und α Maus Alexa 594 wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Zellkernfärbung mit DAPI (100 μ g/ml).

Allerdings zeigten sich in späteren Entwicklungsstadien, wie am Beispiel von 56h zu sehen ist, phänotypisch intakte Zellen. Hier scheint die Lokalisation von LLO auf den Parasiten beschränkt zu sein.

Dass sich der dargestellte Parasit bis zur späten Leberphase hin entwickeln konnte, weist in diesem Fall darauf hin, dass die PVM nicht ausreichend zerstört wurde und sich zumindest einige Parasiten normal entwickeln konnten. Offenbar wird das PbLSA4-LLO-Fusionsprotein nicht in allen Parasiten effizient zur PPM bzw. PV transportiert.

Deshalb sollte mit einem weiteren LLO-Fusionsprotein versucht werden, LLO in die PV zu leiten. Dazu wurde das Signalpeptid des PbExp1-Proteins verwendet, da dieses Protein bekanntermaßen exportiert wird.

3. Ergebnisse

3.7.2 Fusion des PbExp1-Signalpeptids mit GFP

In einem Vorversuch sollte geklärt werden, ob das Signalpeptid von PbExp1 ausreicht, einen fusionierten Proteinrest (in diesem Falle GFP) in den Bereich der PV zu transportieren. Als Ausgangsplasmid fungierte das pPrLSA4GFP-Plasmid. Die *exp1*-Signalsequenz musste wieder über die *BamHI*-Schnittstelle zwischen die *pblsa4*-Promotorregion und dem *gfp*-Gen kloniert werden. Als *template* für die PCR zur Amplifikation der *pbexp1*-Signalsequenz wurde genomische DNA aus dem Blutstadium des Parasiten verwendet. Die Primer 701 und 702 wurden zur Amplifikation der Signalsequenz verwendet. Sie flankieren das PCR-Produkt außerdem mit der Restriktionsschnittstelle *BamHI*. Als Nachweis der korrekten Integration wurde eine PCR mit dem Primerpaar 599 und 702 durchgeführt, welches zu einem 1073bp großen Produkt führt.

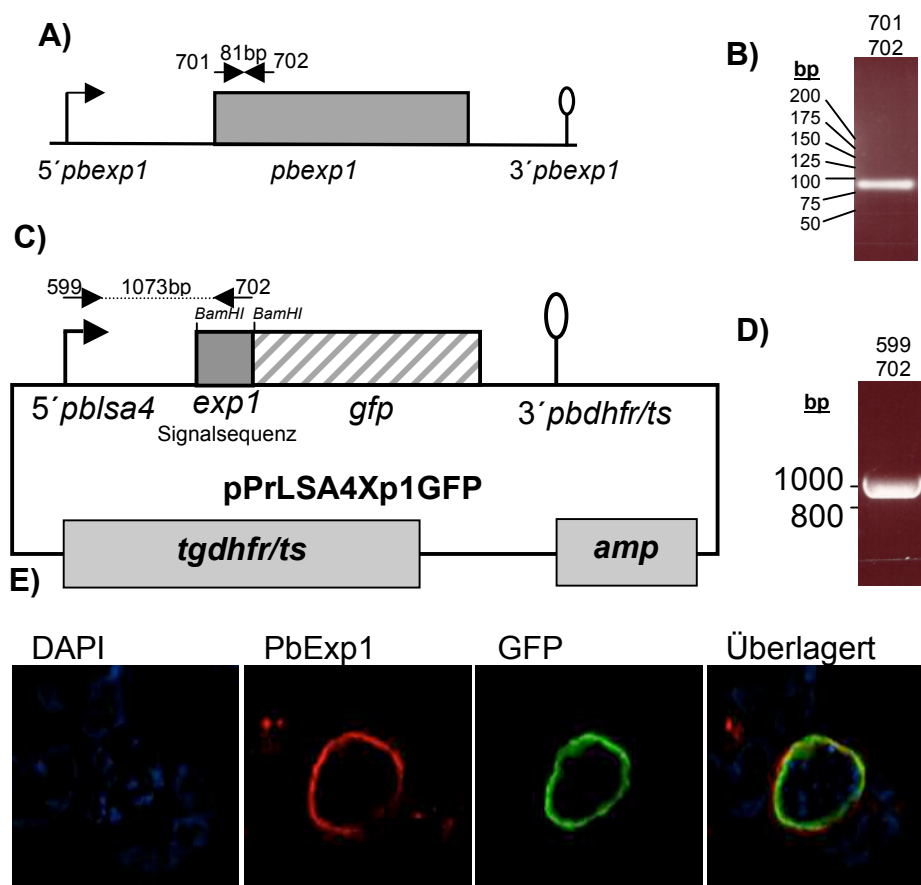


Abb.3.18: Klonierung der *pbexp1*-Signalsequenz in das pPrLSA4-Plasmid zwischen die 5'Region des *pblsa4*- und des *gfp*-Gens.

A) Schematische Darstellung des genomischen *pbexp1*-Locus mit den Primern 701 und 702, zur Amplifikation der Signalsequenz. **B)** Amplifikationsprodukt (81bp) aus einer PCR mit dem Primerpaar 701/702. **C)** Schematische Darstellung des pPrLSA4Xp1GFP-Plasmids **D)** Nachweis der Integration mittels PCR für die *pbexp1*-Signalsequenz nach den in C) eingezeichneten Primern. Das 1073bp große Amplifikationsprodukt wird gebildet. **E)** Konfokale Lasermikroskopie: IF-Analyse mit pPrLSA4Xp1GFP transfizierten Parasiten in 48h infizierten HepG2-Zellen. Erstantikörper α PbExp1 aus Huhn (Verdünnung 1:250) und α GFP aus Kaninchen (1:1000). Zweitantikörper α Huhn Alexa 594 (1:5000) und α Kaninchen Cy2 (1:1000). Zellkernfärbung mit DAPI (100 μ g/ml).

3. Ergebnisse

Das PbExp1-Signalpeptid bewirkt tatsächlich den Export des GFP-Proteins in die PV. Nachdem gezeigt wurde, dass das PbExp1-Signalpeptid geeignet ist, Proteine aus dem Parasiten in die PV zu transportieren, sollte jetzt das Listeriolysin anstelle des GFP-Proteins exprimiert werden.

3.7.3 Expression von Listeriolysin mit dem PbExp1-Signalpeptid

Ausgangsplasmid für dieses Konstrukt war wiederum das pPrLSA4HlyA-Plasmid. Die *exp1*-Signalsequenz wurde in diesem Fall zwischen den Promotorbereich von *pblsa4* und das *hlyA*-Gen kloniert. Auch hier wurde die Schnittstelle *BamHI* verwendet. Nach erfolgreicher Klonierung wurde das Plasmid in *P. berghei*-Schizonten transfiziert und mit den aus den Speicheldrüsen der Mücken gewonnenen Sporozoiten HepG2-Zellen infiziert.

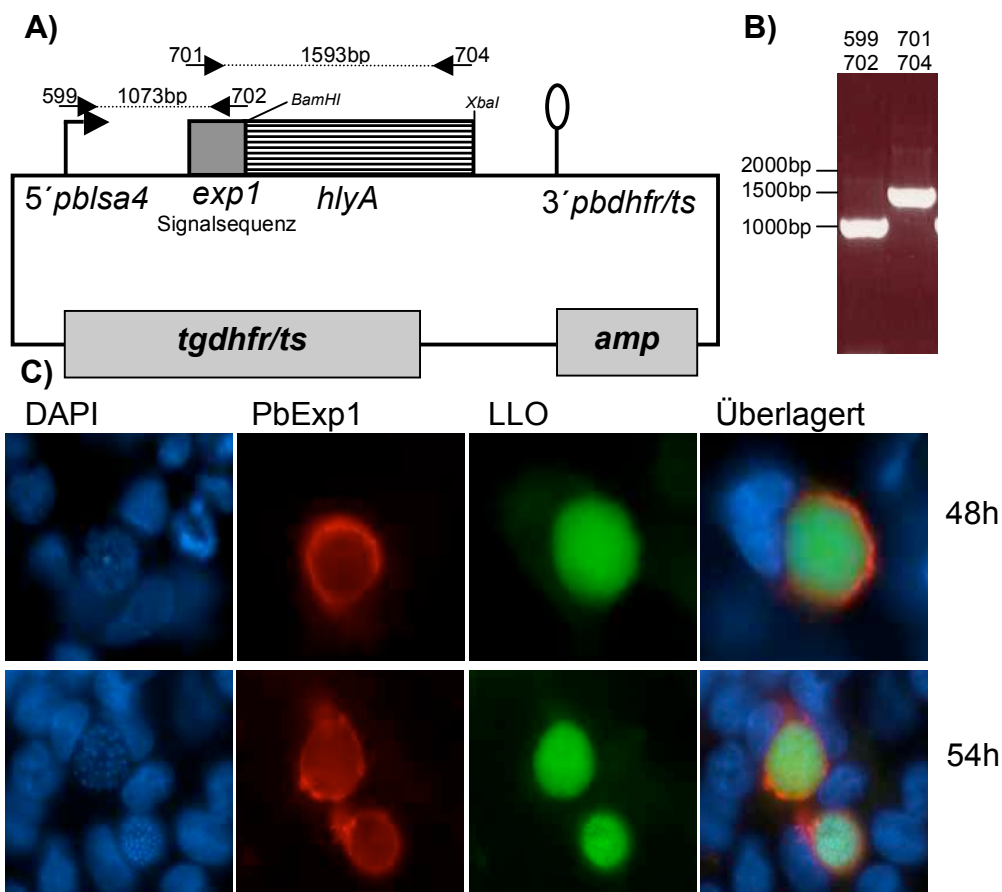


Abb.3.19: Listeriolysin als Fusionsprotein mit PbExp1-Signalpeptid.

A) Schematische Darstellung des pPrLSA4Xp1HlyA-Plasmids **B)** Nachweis der Integration durch PCR mit den in A) eingezeichneten Primern **C)** IF-Analysen der mit pPrLSA4Xp1HlyA transfizierten Parasiten in 48h und 54h infizierten HepG2-Zellen. Erstantikörper α PbExp1 aus Huhn (Verdünnung 1:250) und α LLO aus Maus (Verdünnung 1:250); Zweitantikörper α Huhn Alexa 488 und α Maus Alexa 594 (Verdünnungen jeweils 1:5000). Zellkernfärbung mit DAPI (100 μ g/ml).

3. Ergebnisse

In den IF-Analysen fällt auf, dass Listeriolysin offenbar nicht in die parasitophore Vakuole transportiert worden ist. Zusätzlich zeigen die Färbungen phänotypisch intakte Zellen, die trotz der Anwesenheit von Listeriolysin nicht geschädigt wurden. Auch wenn das Listeriolysin-Protein nicht den gewünschten Effekt hatte, zeigen diese Versuche doch, dass es möglich ist, ein artfremdes Protein unter dem *pb/lsa4*-Promotor Leberphasen-spezifisch zu exprimieren. Damit bietet dieser Promotor interessante Möglichkeiten, Fremdproteine während der Leberphase des Malaria-Zyklus zur Expression zu bringen. Da der in diesem Bereich liegende Promotor erst 25hpi aktiviert wird, wäre ein durch die 5'Region des *pb/lsa4*-Gens reguliertes Toxin, das den Parasiten sicher eliminiert, ein idealer Ansatz zur Herstellung einer Lebendvakzine. Ab 25hpi beginnt der Parasit damit, selbst viele Proteine zu exprimieren, die dann als Antigene von der infizierten Zelle genutzt werden können. Da diese Parasiten wahrscheinlich länger überleben als bestrahlte Parasiten oder genetisch attenuierte Sporoziten, ist eine deutlich verbesserte Immunabwehr zu erwarten. Deswegen sind Leberphasen-spezifische Promotoren im Hinblick auf Arbeiten mit dem humanpathogenen Parasiten *P. falciparum* hochinteressant. Die genetisch so veränderten Parasiten könnten möglicherweise als Lebendvakzine zur Verfügung stehen.

4. Diskussion

4.1 Identifizierung eines sezernierten, Leberphasen-spezifischen Proteins

4.1.1 Proteine mit Pexel-Motiv

Sezernierte Parasitenproteine bieten im Rahmen von Vakzinierungsstrategien gegen Plasmodien interessante Möglichkeiten. Zum einen könnten diese Proteine von den Wirtszellen präsentiert werden, womit sie als Impfstoff in Frage kommen, zum anderen bieten Gene, die für solche Proteine kodieren, ein Ziel für Mutationen, welche die Proteinfunktion hemmen. Solche Parasiten sind dann möglicherweise nicht mehr fähig, die Entwicklung in der Wirtszelle zu vollenden und könnten deshalb als attenuierte Lebendvakzine eingesetzt werden.

Da neben einem Signalpeptid auch das so genannte Pexel-Motiv für die Sezernierung von Proteinen verantwortlich ist (Marti et al., 2004 und Haldar et al., 2004), waren für die vorliegende Arbeit insbesondere solche Proteine interessant, die beide Sequenzen aufweisen. Weitere Auswahlkriterien waren zum einen die Leberphasen-Spezifität des Proteins und zum anderen, dass das Pexel-Motiv sowohl bei *P. berghei* als auch bei *P. falciparum* vorliegt. Im Zuge der Datenbank-Recherche ergab sich, dass im Falle von *P. berghei* eine geringe Anzahl von Proteinen eine Pexel-Sequenz aufweist und noch seltener neben einem Pexel-Motiv zusätzlich ein Signalpeptid vorhanden ist.

Ein Protein, das all diesen Kriterien entsprach, konnte nicht gefunden werden. Daraufhin wurden zunächst Proteine überprüft, die nur über ein Pexel-Motiv verfügen. So wurden Gene, die ein Pexel-Motiv aufweisen, auf Expression während der Leberphase und spätere Sezernierung des resultierenden Proteins hin untersucht. Es handelte sich dabei um die Gene mit der Datenbankbezeichnung *pb000969.02.0*, *pb000639.03.0* und *pb108121.00.0* (Pexel-Motiv nach 25, 50 und 46 Aminosäuren). Für jedes Gen wurden jeweils rekombinante Proteine und entsprechende Antikörper hergestellt. In den IF-Analysen zeigte sich jedoch, dass die jeweiligen Proteine trotz vorhandenem Pexel-Motiv nicht sezerniert werden (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass in den Datenbanken für *P. berghei* nur relativ wenige Proteine mit diesem Motiv zu finden sind, deuten darauf hin, dass die Pexel-Sequenz bei *P. berghei* nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint und die Sezernierung von Proteinen hauptsächlich auf andere Weise vermittelt wird. Auch bei *P. falciparum* gibt es alternative Transportwege zum Pexel-Motiv (Spielmann et al., 2006). Die grundsätzliche Funktion des Motivs ist unbestritten, doch scheint es nicht für alle Plasmodien gleichermaßen von Bedeutung zu sein, obwohl inzwischen gezeigt wurde, dass *P. berghei* in der Lage ist, Proteine mit Pexel-Motiv zu sezernieren (van Ooij et al., 2008). Das Pexel-Motiv ist vornehmlich für die beiden Protein-Familien STEVOR und RIFIN sowie für PfEMP1-Proteine relevant (Hiss et al., 2008). Bezeichnenderweise gibt es diese Proteinfamilien bei *P. berghei* nicht. Sie sind allein für *P. falciparum* charakteristisch.

Das bisher einzige beschriebene Pexel-Protein bei *P. berghei* ist das *circumsporozoite*-Protein (CS-Protein) (Singh et al., 2007). Es enthält ein Signalpeptid und zwei Pexel-Motive innerhalb der ersten 74 Aminosäuren. Die Überprüfung der Funktion des Pexel-Motivs erfolgte über die Fusion dieser 74 Aminosäuren mit GFP, welches schließlich unter anderem in der Wirtszelle nachgewiesen werden konnte. Der Transport wurde unterbrochen, wenn beide Pexel-Motive mutiert waren. Derselbe Zusammenhang wurde bereits überzeugend am Beispiel des KAHR-Proteins von *P. falciparum* gezeigt (Marti et al., 2004). Hierbei war die Lokalisation des KAHRP-GFP-Fusionsproteins im Wirtszellzytosol eindeutig, denn GFP war nahezu ausschließlich in der Wirtszelle zu detektieren. Im Falle des CS-GFP-Fusionsproteins wird jedoch der Effekt der Mutation im Vergleich zu den Negativkontrollen letztendlich nicht deutlich, da für die entsprechenden Aufnahmen unterschiedliche Belichtungszeiten gewählt wurden (Singh et al., 2007). So wurde für Aufnahmen, bei denen das GFP nicht in der Wirtszelle detektiert werden sollte, eine geringere Belichtungszeit gewählt als für die GFP-positiven Wirtszellen. Zusätzlich ist auffällig, dass der Großteil des CS-GFP-Fusionsproteins in der Parasitenzelle verbleibt. Bei einem GFP-Protein, das ausschließlich mit Transportmotiven fusioniert ist, wäre zu erwarten, dass sich dieses Protein überwiegend am Transportziel, nämlich in der Wirtszelle, befindet. Bei CS-GFP-exprimierenden Parasiten ist vergleichsweise wenig GFP in der Wirtszelle zu sehen, während der Anteil an GFP in der Parasitenzelle sehr groß ist.

4. Diskussion

Neben den Sezernierungsmotiven wurde für das CS-Protein auch ein Kern-Lokalisierungs-Signal beschrieben, welches das Protein in den Wirtszellkern transportiert und damit tatsächlich auf die Signaltransduktion der Wirtszelle Einfluss nehmen könnte. Die Fusion verschiedener CS-Protein-Fragmente mit dem zytoplasmatischen Protein Aldolase zeigte, dass nur bei den CS-Fragmenten, die das vermutete Kerntransportmotiv enthielten, eine Akkumulation der Aldolase im Kern der Wirtszelle zu beobachten war. Der Transport von Makromolekülen (wie dem CS-Protein) aus dem Wirtszellzytoplasma in den Kern wird von speziellen Proteinen, so genannten Importinen, in der Kernmembran vermittelt. Da sie substratspezifisch sind, sollte durch *Pull-Down*-Analysen mit nativem CS-Protein und jeweils rekombinanten Importinen gezeigt werden, welches Importin für die Einschleusung des CS-Proteins verantwortlich ist. Da sich herausstellte, dass es sich dabei vornehmlich um die Importine handelt, die auch NF- κ B transportieren, wurde vermutet, dass das CS-Protein den NF- κ B-Import in den Kern stört. Um das zu überprüfen, wurden infizierte und nicht-infizierte HepG2-Zellen nach Gabe von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) *in vitro* miteinander verglichen. Bei infizierten Zellen zeigte sich eine reduzierte Menge an NF- κ B im Kern.

Diese Versuche deuten darauf hin, dass das sezernierte CS-Protein in die Signaltransduktion der Leberzelle eingreift, indem es den Zugang des aktivierten NF- κ B in den Zellkern verhindert. Für den Parasiten ist es von großer Bedeutung, die Wirtszelle auf diese Weise in der Bildung entzündungssteigernder Proteine zu hemmen. Tatsächlich würden im Falle einer Entzündung Makrophagen über die Ausscheidung von TNF- α und Interferon- γ weitere Leukozyten anlocken, was schließlich die Vernichtung der gesamten Parasitenpopulation zur Folge haben kann (Bruchhaus et al., 2007).

Auf Grund der Tatsache, dass das CS-Protein nach Sporozoiten-Invasion jedoch nur 1-4h im Wirtszellkern nachweisbar ist (Singh et al., 2007), mag es in diesem Zusammenhang lediglich eine untergeordnete Rolle spielen. Da der Parasit im Zuge seiner Entwicklung insgesamt rund 43-52h (Janse and Waters, 1995) in der Leberzelle verbringt, kann das CS-Protein nur am Anfang der Leberphase für relativ kurze Zeit auf die Wirtszelle einwirken. Sein Einfluss wäre jedoch zum Ende der Leberphase, wo die Leberzelle mittlerweile 10.000-30.000 Merozoiten beinhaltet, von noch größerer Wichtigkeit.

4. Diskussion

Die Bildung pro-inflammatorischer Proteine zu fördern, ist nur eine von vielen Aufgaben des Proteins NF- κ B. Es begünstigt ebenfalls die Expression anti-apoptotischer Proteine (Shishodia und Aggarwal, 2001). Eine durch das CS-Protein vermittelte Hemmung des NF- κ B sollte die Zelle folglich anfälliger für Apoptose machen. Die gezielte Einleitung der Apoptose bei HepG2-Zellen sowie bei primären Hepatozyten zeigte jedoch, dass infizierte Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten besonders gut vor Apoptose geschützt sind (van de Sand et al., 2005).

Darüber hinaus zeigen zu den Apikomplexa gehörende Parasiten eher die Tendenz zur Anhäufung von aktiviertem NF- κ B im Kern um sich vor Apoptose zu schützen: Theilerien modifizieren z.B. Wirtszellkinasen, die daraufhin den NF- κ B-Inhibitor I κ B α phosphorylieren. Phosphoryliertes I κ B α wird schnell abgebaut und NF- κ B freigesetzt. Das so aktivierte NF- κ B wandert in den Zellkern (Heussler et al., 2002) und induziert die Transkription antiapoptotischer Proteine (Kuenzi et al., 2003).

Eine vermehrte Aktivierung von NF- κ B in der Wirtszelle wird auch für Infektionen mit *C. parvum* (Chen et al., 2001) und *T. gondii* (Molestina et al., 2003; Molestina and Sinai, 2005) sowie *L. major* (Akarid et al., 2004) und *T. cruzi* (Petersen et al., 2006) beschrieben.

4.1.2 Proteine mit Signalsequenz

Um Proteine zu finden, deren Expression auf die Leberphase beschränkt ist, galt schließlich eine Publikation von Sacci Jr. (2005) als Grundlage. Von den darin erwähnten 623 Genen, deren mRNA in der Leberphase vorliegt, werden 155 als Leberphasen-spezifisch beschrieben. Aus letzteren wurden 40 Gene ausgewählt, die eine Signalsequenz aufweisen.

Hiervon wurden zunächst die homologen *P. berghei*-Gene aus vorhandenen Datenbanken identifiziert und anschließend RT-PCR-Analysen des Blut-, Oozysten- und Leberstadiums durchgeführt. Diese wurden stets mit dem konstitutiv exprimierten *PbTubulin* verglichen, welches als Positivkontrolle diente. Bei diesen Analysen besteht generell die Möglichkeit, geringe Mengen einer basal exprimierten mRNA zu detektieren, die keine physiologische Relevanz hat. Durch eine PCR können auch kleine mRNA-Mengen amplifiziert werden, so dass letztendlich die Stärke der Produktbande Aufschluss über die zu Grunde liegende mRNA-Menge gibt. Die Existenz von mRNA für ein bestimmtes Gen ist demnach nicht mit dem

4. Diskussion

Vorliegen des dazugehörigen Proteins gleichzusetzen. Die mRNA kann z.B. nicht translatiert werden. Bei *P. falciparum* wurden durch den Vergleich zwischen *Mikroarray*- und *Maldi-Tof*-Analysen Unterschiede zwischen Transkriptom und Proteom deutlich (Le Roch et al., 2004). Hier scheinen Faktoren der Genregulation zum einen die Translation stabiler mRNAs und zum anderen den schnellen Abbau instabiler mRNAs zu bewirken.

Da im Zuge der RT-PCR-Analysen deutliche Amplifikationsprodukte von Blut-, Leber- und Oozysten-mRNA-Präparationen erzielt wurden, ist es sehr unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um basal exprimierte mRNA handelt. Nur in einem Fall lag eine Leberphasen-spezifische Genexpression vor: Bei *pblsa4* ergab die RT-PCR nur eine deutliche Produktbande in mRNA-Präparationen aus infizierten HepG2-Zellen.

Die Analyse der Expression von *P. yoelii*-Genen während der Leberphase wurde ebenfalls auf mRNA-Ebene durchgeführt (Sacci et al., 2005). Dazu wurden auch RT-PCR-Analysen durchgeführt, bei denen der Gehalt an Wirtszell-mRNA dadurch gering gehalten wurde, dass nur die infizierten Zellen mit Hilfe von Laser-Mikrodissektion aus dem Leberzellrasen ausgeschnitten und gesammelt wurden.

Da *P. berghei* so eng mit *P. yoelii* verwandt ist, dass sich identische Gene problemlos identifizieren lassen, ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die RT-PCR-Analysen auch für jeweils homologe *P. yoelii*-Transkripte gelten. Es muss angenommen werden, dass viele der anderen als Leberphasen-spezifisch bezeichneten Gene auch in weiteren, zum Teil sogar in allen Entwicklungsstadien des Parasiten exprimiert werden.

Bei der cDNA-Synthese der getesteten Stadien wurden stets Kontrollen zur genomischen DNA-Kontamination durchgeführt. Dazu wurde je eine cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase durchgeführt und danach als PCR-*template* eingesetzt. Im Falle genomischer DNA-Kontamination wäre ein Amplifikationsprodukt sichtbar gewesen, obwohl keine cDNA vorliegen dürfte. Zudem wurden auch Fragmente amplifiziert, die in genomischer DNA Introns aufweisen und bei gDNA-Kontamination folglich zu größeren Amplifikationsprodukten geführt hätten. Die von Sacci Jr. et al., (2005) gefundenen Ergebnisse für die 40 überprüften Gene können bezüglich der Leberphasen-spezifischen Expression daher bis auf eine Ausnahme nicht bestätigt werden. Dies wird auch anhand einer neueren Veröffentlichung deutlich, in der ebenfalls eine Transkriptom-Studie über Leberphasen-spezifisch exprimierte Gene durchgeführt wurde (Tarun et al., 2008). Eine für das Leberstadium spezifische

4. Diskussion

Expression des *pblsa4*-Gens (pb103464.00.0) wird bestätigt, während die übrigen 39 Gene nicht angegeben sind.

Im Falle von *pblsa4* sollte die Überprüfung weiterer Zeitpunkte innerhalb der Leberphase zeigen, ab wann die mRNA nachweisbar ist und ob die Konzentration noch ansteigt bzw. wieder abfällt. Die hier erarbeiteten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *pblsa4* eher zum Ende der Leberphase hin vom Parasiten exprimiert wird. Da 16hpi kein Amplifikat zu sehen ist, wird PbLSA4 vermutlich erst während der Schizogonie vom Parasiten benötigt.

4.2 Sezernierung des Proteins PbLSA4

Für die Expression des PbLSA4-GFP-Fusionsproteins wurde der endogene *pblsa4*-Promotor eingesetzt. Auf diese Weise wurden etwaige Fehler im Proteintransport umgangen, die unter der Verwendung anderer Promotoren hätten auftreten können: Bei der Fusion von GFP mit dem *ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA)* unter der Kontrolle des im Transfektionsplasmid enthaltenen *pfhsp86*-Promotors wurde das Fusionsprotein in der PV gefunden, obwohl bereits bekannt war, dass das endogene Protein normalerweise zur erythrozytären Plasmamembran transportiert wird. Erst nach Austausch des *pfhsp86*-Promotors gegen den natürlichen *resa*-Promotor erfolgte der Transport des Fusionsproteins erwartungsgemäß zu der natürlichen Position (Rug et al., 2004). Für einen korrekten Proteintransport kann also auch der Expressions-Zeitpunkt von entscheidender Bedeutung sein (Rug et al., 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass PbLSA4 in die PV und die PPM transportiert wird. Im Vergleich zum nicht-fusionierten GFP, welches weitgehend gleichmäßig im Zytosol des Parasiten vorliegt, ist das PbLSA4-GFP außerhalb des Parasiten zu sehen. Im Lumen der PV zeigt sich PbLSA4-GFP jedoch nicht überall, so dass eine Lokalisation in bzw. an der Parasiten-Plasmamembran wahrscheinlich ist.

In den IF-Aufnahmen liegt GFP-markiertes PbLSA4 als geschlossener Ring um die Parasitenzelle vor, während in WT-Parasiten PbLSA4 in einer unterbrochenen Ringstruktur um den Parasiten angeordnet ist. Da in transgenen Parasiten mit α GFP-

4. Diskussion

und α PbLSA4-Antikörpern gleiche Strukturen angefärbt wurden, handelt es sich wahrscheinlich um einen Überexpressionseffekt, wobei so viele Moleküle des Fusionsproteins zum Zielort transportiert werden, dass sie den Parasiten schließlich ringförmig umgeben.

4.3 Mutation des Gens *pblsa4*

Zur weiteren Charakterisierung sollte das *pblsa4*-Gen durch Deletion mutiert werden. Zusätzlich sollte dieses Experiment klären, ob ein verkürztes PbLSA4-Protein den Parasiten so schwächt, dass er seine Entwicklung in der Leberzelle nicht beenden kann.

Die Mutation von Genen durch Integration eines Plasmids wurde bei *P. berghei* bereits für die Gene der über 600 Aminosäuren umfassenden Proteine TRAP (Sultan et al., 1997) und KAHRP (Crabb et al., 1997) gezeigt. Auch wenn in diesen Beispielen keine funktionsfähigen Proteine mehr vorliegen, handelt es sich definitionsgemäß nicht um einen *Gen-knock-out*. Im Falle einer Plasmid-Integration sind noch Genbereiche vorhanden, die jedoch nicht mehr für ein vollständiges Protein kodieren. Unvollständige Proteine können allerdings erkannt und durch das Proteasom abgebaut werden. In diesem Fall ist kein Protein, auch nicht das unvollständige, in der Zelle zu detektieren, was mit der Auswirkung eines *knock-outs* gleichzusetzen wäre. Die gezielte Veränderung von Genen wird als *gene targeting* bezeichnet (de Koning-Ward et al., 2000).

Ein erfolgreicher Einbau des Plasmids ins Genom wird durch Enzyme vermittelt, die normalerweise einen Doppelstrangbruch reparieren (Szostak et al., 1983). Die Sequenz des Gens, das verändert werden soll, wird in das Insertionsplasmid kloniert und sollte dabei aus dem mittleren Genbereich stammen, da andernfalls die Insertionseffizienz reduziert wird. Der Bereich, welcher die Linearisierungsstelle flankiert, wird stets von Exonukleasen erweitert, so dass in 5'- und 3'-Richtung mindestens 250bp einzuplanen sind (Nunes et al., 1999).

Nach erfolgter Insertion sind große Proteine, wie TRAP oder KAHRP nicht mehr funktionsfähig, weil umfangreiche Sequenzabschnitte wegfallen. Um optimale Bedingungen für den *Single-crossover* zu erreichen, konnten bei PbLSA4 dagegen

4. Diskussion

nur 92 Aminosäuren entfernt werden. Die Vermutung, dass die so erzeugten unvollständigen PbLSA4-Moleküle über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut werden, wurde angesichts der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht bestätigt. Das Insertionsplasmid wurde so konstruiert, dass bei erfolgreicher Integration und intaktem Protein GFP detektiert werden konnte. In der IF-Analyse war auffällig, dass in den Parasiten mit erfolgreicher Plasmid-Integration keine Vesikelstruktur zu sehen war. Die veränderte Proteinstruktur könnte also für eine andere Verteilung von PbLSA4 im Parasiten verantwortlich sein. Dies scheint jedoch keinen sichtbaren Einfluss auf die Entwicklung des Parasiten zu haben, da sich die transgenen Parasiten normal entwickelten.

Zu späteren Entwicklungszeitpunkten, wie z.B. 65hpi, zeigten die Parasiten mit Integration im Gegensatz zu jenen ohne Insertionsplasmid das Protein auch in der Wirtszelle. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass das verkürzte PbLSA4 seinen Wirkort an der PPM zwar zunächst erreicht, jedoch nicht mit den dortigen Bindungspartnern interagieren, also nicht gebunden werden kann. Es läge demnach zunächst frei im Lumen der PV vor. Nach Auflösung der PVM könnte es dann in das Zytosol der Wirtszelle eindringen.

Dieser Vermutung nach müsste es sich tatsächlich um ein sezerniertes Protein handeln, welches normalerweise in die PV gelangt, um dort mit Proteinen an der PPM in Interaktion zu treten. Die entsprechende Bindestelle müsste dabei innerhalb der durch die Deletion fehlenden 92 Aminosäuren liegen. In diesem Proteinabschnitt wurden verschiedene Phosphorylierungsmotive wie z.B. für Tyrosin-Kinasen (Hunter, 1982) oder Serin/Threonin-Kinasen (Yaffe and Elia, 2001) gefunden, die für die Funktion und Lokalisierung eine Rolle spielen könnten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmidintegration erfolgreich, die Insertion für den Parasiten jedoch nicht letal war. Dass die Parasiten durch die beschriebene Mutation nicht attenuiert werden konnten, liegt möglicherweise daran, dass die 300 Aminosäuren große Variante des PbLSA4-GFP-Fusionsproteins ausreicht, um die Funktion des Proteins auszuüben. Darüber hinaus wäre denkbar, dass der Parasit eine fehlende Proteinfunktion durch ein anderes Protein kompensieren kann.

Selbst wenn das PbLSA4-Protein für den Parasiten nicht essentiell ist, bietet der Promotor dieses Gens eine interessante Möglichkeit, den Parasiten anderweitig zu schwächen. So wäre es denkbar, mit Hilfe dieses Promotors ein Gen zu exprimieren,

4. Diskussion

welches für ein plasmodizides Protein kodiert. Auf Grund der Leberphasen-Spezifität des Promotors könnte somit der Parasit während der Leberphase eliminiert werden.

4.4 Charakterisierung eines Leberphasen-spezifischen Promotors

Um zunächst den *pblsa4*-Promotor zu charakterisieren und auf Leberphasen-Spezifität hin zu überprüfen, wurde der 5' Bereich des *pblsa4*-Gens von dessen Start-Codon bis zum davor liegenden Gen (989bp) vor das *gfp*-Gen kloniert. Anhand der GFP-Expression konnte dann die Aktivität des Promotors in allen Lebensphasen des Parasiten untersucht werden. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich für den konstitutiven Promotor des Elongationsfaktor 1 α -Proteins verwendet (Franke-Fayard et al., 2004). Mit diesem Plasmid transfizierte Parasiten exprimieren GFP in jeder Lebensphase und bieten so die Möglichkeit, den Parasiten *in vivo* innerhalb von Geweben zu beobachten. Anhand GFP-exprimierender Parasiten konnte z.B. gezeigt werden, wie ein Merosom das Blut in den Leber-Sinusoiden erreicht (Sturm et al., 2006). Die Aktivität des *pblsa4*-Promotors ist dagegen nur im Leberstadium und erwartungsgemäß erst nach 30h nachweisbar. Der *elongationsfaktor 1 α* -Promotor wird als starker Promotor beschrieben (Franke-Fayard et al., 2004). Die beobachtete starke GFP-Expression unter dem *pblsa4*-Promotor ist demnach entweder darauf zurückzuführen, dass auch dieser sehr aktiv ist oder aber die Parasiten viele Plasmide aufgenommen hatten. Im Zuge der Transfektion nehmen die Schizonten unterschiedlich viele Plasmide auf, so dass ein Parasit je nach Plasmidanzahl mehr oder weniger GFP exprimiert. Da sich in allen PrLSA4GFP-transfizierten Parasiten eine vergleichbar starke GFP-Expression zeigte, wurde vermutet, dass der *pblsa4*-Promotor in der späten Leberphase des Parasiten ebenfalls sehr aktiv ist.

Eine sukzessive Verkürzung des Promotorbereichs sollte nun der Bestimmung des Minimalpromotors dienen. Dieser könnte für die Identifizierung anderer Leberphasengene von Nutzen sein und helfen Transkriptionsfaktoren zu definieren, die während der Leberphase des Parasiten exprimiert werden und aktiv sind.

4. Diskussion

4.4.1 Mögliche DNA/Protein-Wechselwirkungen und Deletionsanalysen in der Promotorregion von *pblsa4*

Die Transkriptionssteuerung erfolgt durch regulatorische Proteine, die entweder gemeinsam mit einer RNA-Polymerase an eine spezifische Promotorsequenz binden und so direkt die Transkription starten oder sich an bestimmte Regulationsstellen in der Promotorregion anlagern. Dort stimulieren sie als Aktivatoren oder inhibieren als Repressoren die Transkription. Ob und wie stark ein Gen transkribiert wird, hängt dabei von der Kombination solcher Faktoren ab. Zeitgleich transkribierte Gene weisen oft ähnliche Motive in ihren jeweiligen Promotorregionen auf. Aus diesem Grund könnten durch Bestimmung der genauen Promotorsequenz des *pblsa4*-Gens andere Leberphasen-spezifisch exprimierte Gene identifiziert werden.

Bei eukaryotischen Zellen sind Regulationseinheiten wie z.B. die TATA-Box bekannt. Auch bei *P. falciparum* wurden schon Proteine identifiziert, die Homologien zu TATA-Box-Bindeproteinen aufweisen (McAndrew et al., 1993). Da der untranslatierte Bereich im Genom von Plasmodien jedoch zu über 90% AT-reich ist (Militello et al., 2004), bereitete die Identifikation der TATA-Box Schwierigkeiten (Le Roch et al., 2004). Weitere bekannte Regulationseinheiten in eukaryotischen Genomen sind die CAAT-Box und die GC-Box. Diese bestimmen jedoch weniger ob, sondern eher wie häufig das ihnen folgende Gen abgelesen wird. In der Promotorregion von *pblsa4* findet sich nach 128bp in 5'Richtung eine CAAT-Box (siehe Abb.4.1, grün markiert). Es ist jedoch unklar, ob sie als Bindestelle relevant und damit aktiv ist. Strukturen, die der GC-Box entsprechen, sind in der Promotorregion von *pblsa4*-Bereich nicht zu detektieren. Bei Plasmodien ist allerdings für eine Reihe von *heat-shock*-Proteinen eine palindromische GC-Anordnung gefunden worden, die von den Autoren als G-Box bezeichnet wurde (Militello et al., 2004). Auch die für die Expression in Blutstadien wichtigen Motive CATGCACATAT und TTTTCTCCC (Di Girolamo et al., 2005) liegen in der Promotorregion von *pblsa4* nicht vor.

Nachdem also keine allgemeinen Regulationsmotive gefunden wurden, sollte der 5'Promotorbereich schrittweise verkleinert werden, um schließlich den Minimalpromotor bestimmen zu können. Der 5'Promotorbereich verlor dabei durch sukzessive Verkleinerung seine Leberphasen-Spezifität und zeigte im Falle der Konstrukte 881-884 (siehe Abb.4.1, rot markiert) eine GFP-Expression innerhalb der Oozysten bzw. der Sporozoiten.

4. Diskussion

In diesem Zusammenhang ist die Nukleotidsequenz CATGCAN interessant. Das Motiv befindet sich ebenfalls in der Promotorregion von *pb/lsa4*, genauer 228bp vor dem Start-Codon (siehe Abb.4.1, gelb markiert), und ist offenbar für die Expression bekannter Sporozoitenproteine wie TRAP (*thrombospondin related protein*) oder CSP (*circumsporozoite protein*) von Bedeutung (Young et al., 2008). Ein Repressorprotein, das am 5'Ende der Promotorregion bindet und damit eine Expression während der Sporozoitenphase verhindert, könnte durch eine Verkleinerung dieses Bereichs seine Bindestelle verlieren, woraufhin das CATGCAN-Motiv abgelesen und folglich GFP auch im Mückenstadium exprimiert wird. Konstrukt 880 ist mit einer Größe von 70bp das kleinste Fragment und weist das beschriebene Motiv nicht auf. Es ist zudem das einzige Konstrukt, welches in keinem Stadium GFP-Expression zeigt. Allerdings handelt es sich bei diesem Fragment höchstwahrscheinlich um die 5'untranslatierte Region (5'UTR) von *pb/lsa4*. Diese Region wird bei der Expression des *pb/lsa4*-Gens als mRNA synthetisiert und enthält keine Promotorsequenzen.

Eine spezifische Repressorsequenz in der Promotorregion ist unbekannt. Es kommen lediglich mehrfach palindromische TGCA-Sequenzen vor, die durch DNA-Methylierung das folgende Gen inaktivieren können. Eine DNA-Methylierung ist jedoch irreversibel und die plötzliche Aktivierung des Gens auf Grund der beginnenden Leberphase daher nicht möglich.

Das Motiv GCATAT des *elongationsfaktor 1 α* -Promotors, hat offenbar Einfluss auf dessen Aktivität (Azevedo and del Portillo, 2007) und findet sich zweimal in der *eef1 α* -Promotorregion. In der 5'Region vor *pb/lsa4* liegt das Motiv fünfmal vor. Die Konstrukte zeigen es je nach ihrer Größe vier- (884), zwei- (883 und 882) oder einmal (881). Im Konstrukt 880 ist diese Basenkonstellation nicht vorhanden.

Der starke Promotor des Gens für den Elongationsfaktor 1 α (Franke-Fayard et al., 2004) befindet sich im pL0017-Plasmid und sorgt dort für eine konstitutiv hohe GFP-Expression. Sollte diese Sequenz einen verstärkenden Effekt hinsichtlich der Expression des Proteins besitzen, müsste der *pb/lsa4*-Promotor entsprechend noch stärker sein. Die Konstrukte 884 (4x GCATAT) und 883 bzw. 882 (je 2x GCATAT) zeigten jedoch eine etwa gleich schwache GFP-Expression. Dem GCATAT-Motiv konnte im *pb/lsa4*-Promotor also keine eindeutige Funktion zugeordnet werden.

Durch die Deletionsanalysen wurde gezeigt, dass offensichtlich die gesamte Promotorregion aufwärts vom Start-Codon des Gens *pb/lsa4* notwendig ist, um eine

4. Diskussion

Leberphasen-spezifische Expression zu gewährleisten. Susanne Helm (AG Heussler) konnte durch einen *expressed-sequence-tag* (EST) inzwischen klären, dass ca. 200bp vor dem Start-Codon von *pblsa4* die 5'untranslatierte Region beginnt. Da diese Analysen auf der Basis von mRNA gemacht werden, kann ausgeschlossen werden, dass sich der Promotor für *pblsa4* in diesem Bereich befindet.

Die für *pblsa4* gefundenen Ergebnisse hinsichtlich der mRNA-Expression während der Leberphase und dem zeitlichen Expressionsverhalten wurden durch *Mikroarray*-Analysen bezüglich des Transkriptoms der Leberphase von *P. yoelii* (Tarun et al., 2008) bestätigt. Für alle beschriebenen *P. yoelii*-Gene werden dort die jeweils zugehörigen homologen *P. berghei*-Gene genannt. Unter anderem wird auch das Gen *pb103464.00.0* erwähnt, welches dem in dieser Arbeit untersuchten *pblsa4* entspricht. Die Ergebnisse der *Mikroarrays* decken sich also mit den Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

5' Promotorbereich von *pblsa4*:

```
AGA GTT GCA TTA TCG TCA AAA GTG TAT AAA ATT ATA AAA TAG AGC AAC ATA AAA TGG
ATA ATA ATG GTG AAA CTA AAA ATA ATA AAA TTA AAG TTG GGT AAA TAA AAA CAC AAC
ATA AAG GAT CAA GGT ATT ATT TTT TTA AAT TTT TTT TAT GAA AAA CTA TTA GAA CAA
TTT AAA ATA ATG CAT ATT ATG CTT TAT TTG TAC AAT ATA ATT AAA ATA AAA CGA ATA
ACG ATG TGA TTA TTC AAT ATG CAG ATT AAT AAT ATA TAC ACA TGT AAA TGT ATA TAT
ACT TCT TCA TTG TCA AAT TCC TTA GGC ATA TGT AGC ATA TAT GGT TTT TGA CGG TTC
TTT AAA AAT ATA CAA CTG TAA TCC CTA ATA AAT GAA TGC AGT TGA AAT CGA ACA AAT
CCA TAT GCT TCC GTA TCG ATT TAA CCA TTT AGG TAG TGA TCT ATG ATC GAT CTA CAT
GTG AAG AAA ATT GGC ATC TTT TAA AAA CTC TTT CAT AAT GGT TTA TGA GTT CTT TAG
ATC ATA TAT TAT TTA AAC AAA AAA TAA AAT AAA TCA CCT ATT TTT TTA TAT TCG ATA
AAG CGT GCA AAC AAA TTT GCA TGT ATG TAT TCT ATT ATC GTT GGT TTT TTT TAC ACC
ACC TTT TTT TTA TTT ATA ATG TTT TTC ACC ACA AAG CAA CTA TAT ATA AAA AAC ACA
CTA AAA ATA TAT AAT TAA ATT AAA AAA TAA TAA TAA AGA AAA TAA AAA ATA AAA AAT
AAA AAG CAT ATG TAT TAT ACA TGC ATG TAT ATT CCC TGC ATA TGT ATG TTT TCA GTT
CAG ATT AAG AAC AAA AAA ATA CAG ATA ATT AAG CAT TTA TTT GTT ACG TTT ATA CAT
GTC AAT ACC AAA AAT ATA TAT GTG CCT ACA CAT GTT ACA TAT AAG TAG ATA CAT ATA
AAT ATA TCG GAG TAA TAT TCT TCT TCT TTC ATT TTT CAC TTC TAT CAT AAT CAT TTT
ACT TTT TAA ACA TAA AAA ATG
```

Abb.4.1: Sequenz des Promotorbereichs von *pblsa4*. In rot sind die Primer 880-884 eingezeichnet und nummeriert, wobei der Primer 880 näher am Start-Codon von *pblsa4* (dick gedruckt und unterstrichen) liegt und 884 am weitesten davon entfernt liegt. Des Weiteren sind die GCATAT-Sequenzen (violett) sowie die CATGCA-(gelb) und die CAAT-Box (grün) markiert.

4. Diskussion

4.5 Attenuierung des Parasiten

Für die Anwendung geschwächter Parasiten als Lebendimpfstoff ist es notwendig, den Parasiten gezielt in einer bestimmten Entwicklungsphase abzutöten.

Es wurden bereits verschiedene Ansätze für die Entwicklung eines Lebendimpfstoffs beschrieben, welchen die spezifische Schwächung des Parasiten zu Grunde liegt: Die bekannteste Impfstrategie mit Plasmodien als Lebendvaccine sind radioaktiv bestrahlte Sporozoiten (*radioactive attenuated sporozoites*, RAS) (Nussenzweig et al., 1967). Die so behandelten Parasiten sind noch in der Lage, die Leberzellen zu infizieren. Auf Grund der erfolgten Bestrahlung ist ihre DNA jedoch so stark geschädigt, dass sie sich nicht weiter entwickeln und bald darauf absterben. Die Höhe der jeweiligen Strahlendosis ist bei dieser Methode entscheidend: Ist sie zu hoch, sterben die Parasiten sofort und erreichen gar nicht erst die Leberzellen. Ist sie jedoch zu niedrig, besteht die Gefahr, dass einige Parasiten die Leberphase überleben und es zur Blutphase kommt.

Neben der Attenuierung durch Bestrahlung wurden verschiedene genetische Manipulationen (*genetically attenuated sporozoites*, GAS) durchgeführt, um den Malaria-Erreger zu schwächen:

P. berghei-Parasiten, die nicht in der Lage sind das Protein P36p zu bilden, sterben zu Beginn der Leberphase. Die infizierte Leberzelle leitet daraufhin die Apoptose ein (van Dijk et al., 2005). Auch im Falle eines *uis3-knock-outs* degeneriert der Parasit kurz nach Eindringen in die Leberzelle (Mueller et al., 2005b). UIS3 ist ein Protein, das in Sporozoiten hochreguliert wird (UIS = *upregulated in infectious sporozoites*). Der *knock-out* dieses Gens führt dazu, dass diese Sporozoiten zwar noch Leberzellen infizieren können, dann jedoch absterben. Die Proteine, die der Parasit dann in der Leberzelle hinterlässt, induzieren über MHC-Klasse-I-Präsentation eine sterile Immunität. Inzwischen wurde auch ein Doppel-*knock-out* mit den Genen *uis3* und *uis4* durchgeführt (Jobe et al., 2007). Durch einen Doppel-*knock-out* lässt sich die Gefahr von durchbrechenden Infektionen deutlich verringern (Labaied et al., 2007).

Unter Anwendung dieser Strategien wird ein Impfschutz nur durch Gaben von zwischen 10.000 und 50.000 Sporozoiten pro Immunisierung erzielt (Labaied et al., 2007; Mueller et al., 2005a; Mueller et al., 2007; Mueller et al., 2005b; Tarun et al., 2007; van Dijk et al., 2005). Diese Mengen an Sporozoiten müssen wahrscheinlich

4. Diskussion

eingesetzt werden, weil die Parasiten zu Beginn der Leberphase absterben. Zu diesem Zeitpunkt liegt der Parasit entweder noch als Sporozoit oder als frühe Leberphasen-Form vor und exprimiert relativ wenig Proteine. Würde der Parasit erst gegen Ende der Leberphase absterben, hätte er sich bis dahin durch Schizogonie bereits tausendfach vermehrt, so dass eine Immunisierung wahrscheinlich mit deutlich weniger Sporozoiten erfolgen könnte. Das wäre hinsichtlich der Entwicklung eines Impfstoffs von großem Vorteil.

Der *pb/lsa4*-Promotor ist nachweislich erst im späteren Verlauf der Leberphase aktiv. Deshalb sollte die Transkription eines defekten *pb/lsa4*-Gens klären, ob Parasiten, bei denen das PbLSA4-Protein fehlerhaft ist, bereits so stark geschwächt sind, dass sie als attenuierte Lebendvakzine in Frage kommen. Die gewählte *gene-targeting*-Strategie, die Integration eines Plasmids in das auszuschaltende Gen, wurde z.B. im Falle des Gens *p36p* bereits erfolgreich angewendet (van Dijk et al., 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente weisen zwar darauf hin, dass sich ein unvollständiges PbLSA4-Protein nicht letal auf den Parasiten auswirkt, doch darf dabei nicht außer Acht gelassen werden, dass die Funktion des Proteins möglicherweise noch nicht ausreichend eingeschränkt war (siehe 4.3).

Eine alternative Strategie ist die gezielte Expression eines toxischen Gens unter dem *pb/lsa4*-Promotor. Die Expression eines artfremden Proteins wurde im Rahmen von Lebendvakzine-Versuchen für *P. berghei* bisher noch nicht durchgeführt. Der Einbau eines für ein toxisches Protein kodierenden Gens in den *pb/lsa4*-Locus hätte möglicherweise eine doppelte Attenuierung zur Folge: Das Fehlen des LSA4-Proteins einerseits und die Expression eines toxischen Proteins andererseits. Durch diese Doppelstrategie soll ein Erreichen der Blutphase weitgehend ausgeschlossen werden.

Ein möglicher Ansatz für eine Attenuierung des Parasiten wurde durch die vorliegende Arbeit gezeigt.

4.6 Expression des Proteins Listeriolysin O (LLO)

Für die Attenuierung des Parasiten durch die Expression eines toxischen Proteins wurde zunächst das prokaryotische Listeriolysin aus *Listeria monocytogenes* gewählt.

4. Diskussion

Es ist bereits gelungen, einen LLO-sezernierenden Mykobakterienstamm als Lebend-Impfstoff gegen Tuberkulose einzusetzen (Grode et al., 2005). Grundlage dieser Strategie war, dass Mykobakterien Listeriolysin exportieren und dadurch das Phagosom verlassen können. Im Zytosol der Wirtszellen konnten Teile von Bakterien-Proteinen dann als Antigen präsentiert werden, was letztlich in einem Impfschutz resultierte. Hier wurde Listeriolysin also dazu verwendet, die Bakterien in das Zytosol der Wirtszelle zu bringen. Eine ähnliche Strategie war für die LLO-Expression von Plasmodien vorgesehen. So sollte der Export des LLO zu einer Zerstörung der PVM führen, so dass die Plasmodien in Kontakt mit dem Wirtszellzytosol kommen. Da bei diesen Versuchen LLO in einer pH-neutralen Umgebung exprimiert wird, wurde mit einer mutierten Variante des Listeriolysins gearbeitet, die auch bei neutralem pH-Wert aktiv ist. Darüber hinaus wurden Versuche unternommen, den Parasiten direkt zu schädigen, indem Listeriolysin vom Parasiten zytosolisch exprimiert bzw. zur Plasmamembran transportiert wird.

Obwohl die LLO-Expression in Plasmodien erfolgreich war, hatte sie offenbar keinen Einfluss auf Parasiten-Plasmamembran oder PVM. Die fehlenden Effekte auf die PVM sind einerseits darauf zurückzuführen, dass LLO größtenteils nicht sezerniert wurde. Andererseits könnte die molekulare Zusammensetzung der PVM ausschlaggebend sein. Warum aber auch die PPM nicht vom LLO angegriffen wurde, ist nicht bekannt. Denkbar wäre, dass Listeriolysin im Zytosol sehr schnell ubiquitiniert wird, um es der Protein-Degradation zuzuführen. Die Protein-Sequenz von Listeriolysin weist N-terminal eine Häufung der Aminosäuren Prolin (P), Serin (S) und vereinzelt Threonin (T) auf. Dabei könnte es sich um eine so genannte PEST-Struktur handeln (Schnupf et al., 2006). Die nach ihren Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) benannte Sequenz findet sich bei Proteinen, die nach ihrer Entstehung sehr schnell wieder über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut werden müssen (Schnupf et al., 2006). Ubiquitinierte Listeriolysin-Monomere können möglicherweise keine Oligomere und somit keine Poren bilden. Dieses Motiv findet sich möglicherweise deshalb bei Listeriolysin, weil Listerien nach ihrer Flucht aus dem Phagosom die Lyse der Wirtszelle verhindern müssen, um in ihr überleben zu können.

In Erythrozyten wird die PVM nach Eintritt eines Merozoiten zunächst umgebaut. Einige Wirtsproteine, wie z.B. Stomatin, werden aus der Membran ausgeschlossen,

4. Diskussion

andere wie z.B. Flotilin-1 bzw. -2 dagegen angereichert (Murphy et al., 2004). Die Anreicherung von Proteinen findet vorwiegend in so genannten *rafts* statt. Hierbei handelt es sich um Cholesterol-reiche Membranregionen, die sich durch ihren Protein- und Lipidaufbau von den anderen Membranbereichen unterscheiden und vermehrt Rezeptor- und Transporterproteine enthalten. Experimente, in denen das Cholesterol aus der Erythrozytenmembran entfernt wurde, zeigten, dass dieser Umstand keinen direkten Einfluss auf die rote Blutzelle hat, wohl aber eine Infektion durch Plasmodien verhindert (Samuel et al., 2001). Gleichzeitig wird vermutet, dass *Plasmodium* den Cholesterolanteil der PVM zusätzlich erhöhen kann (Murphy et al., 2004). Inzwischen konnte in mit *P. berghei* infizierten Hepatozyten durch den Einsatz des spezifischen Cholesterol-Farbstoffs *Filipin* tatsächlich eine zusätzliche Anreicherung von Cholesterol in der PVM nachgewiesen werden (Bano et al., 2007). Cholesterol erhöht die Fluidität der *raft*-Bereiche und modifiziert damit die Aktivität dort positionierter Kanäle. Die Entfernung von Cholesterol aus der PVM von mit *P. berghei* infizierten Hepatozyten durch Cyclodextrin hemmt den Transport des Farbstoffs *Cascade Blue*, welcher bei hohem Cholesterolgehalt ungehindert transportiert wird (Bano et al., 2007). Ein hoher Cholesterolgehalt in der PVM ist offenbar notwendig, damit die Proteinkanäle und Transporter funktionieren und den erhöhten Nährstoffbedarf des Parasiten decken können.

Demnach liegt das Schlüsselmolekül für die Wirkung von Listeriolysin in der PVM vor. Dennoch scheinen die Cholesterol-abhängigen Zytolysine die PVM im Gegensatz zur Wirtszellmembran kaum anzugreifen. So bewirkte z.B. das dem Listeriolysin strukturell sehr ähnliche Streptolysin zwar die Auflösung infizierter roter Blutzellen, doch blieb die PVM in den getesteten Streptolysin-Konzentrationen unbeschadet (Ansorge et al., 1996). Allerdings wurde in den entsprechenden Versuchen das Streptolysin stets von außen auf die Wirtszellen gegeben. Eine Sezernierung durch den Parasiten, wie in vorliegender Arbeit angestrebt, ist für Plasmodien bisher nicht untersucht worden. Demnach ist auch nicht bekannt, welchen Einfluss Listeriolysin auf die PPM bzw. die Innenseite der PVM hat.

Für die LLO-Expression des Parasiten wurde stets das punktmutierte Gen *hlyA* (L461T) verwendet. Wie bereits erwähnt, ist dieses LLO auch im neutralen pH-Bereich aktiv (Glomski et al., 2002). Die Anreicherung von LLO im Zytosol reicht aus, um die jeweilige Zelle zu lysieren. Dieser Effekt wurde sowohl an J774-Makrophagen als auch an Erythrozyten nachgewiesen (Bavdek et al., 2007). Die zytosolische LLO-

4. Diskussion

Expression im Parasiten hätte also durchaus in einer Attenuierung resultieren können. Das mutierte LLO würde aber auch mit der Wirtszellmembran interagieren und möglicherweise dessen Zelltod herbeiführen. Eine solche Wirtszelle wäre natürlich nicht mehr in der Lage, Parasiten-Antigene zu präsentieren. Der *cross-priming-pathway* bzw. die *cross-presentation* bietet in so einem Fall dennoch die Möglichkeit, eine MHC-I-induzierte T-Zell-Antwort zu provozieren. So sind APCs (*antigen-presenting-cells*) in der Lage, Antigene von nekrotischen oder apoptotischen Zellen zu präsentieren (Basta and Alatery, 2007).

Auf Grund der Lokalisation von PbLSA4 in der PV bzw. der Plasmamembran von *P. berghei* war die Fusion LLO und PbLSA4-Protein naheliegend. Das prokaryotische Signalpeptid, das sich natürlicherweise am N-Terminus von Listeriolysin befindet, wurde nicht getestet, da Unterschiede zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Signalpeptiden sehr groß sind (Nielsen et al., 1997).

Für das Experiment, die PVM zu zerstören, wurde in einem Vorversuch das Exp1-Signalpeptid fusioniert mit GFP von *P. berghei* exprimiert. Ähnliche Versuche wurden bereits mit Blutzellen durchgeführt (Adisa et al., 2003). Auch in diesem Fall wird von einer Sezernierung des GFP in die PV ausgegangen. Allerdings wurde keine Ko-Färbung des endogenen Exp1 und des rekombinanten Exp1-GFP-Fusionsproteins durchgeführt, so dass ein direkter Vergleich zu den hier gefundenen Ergebnissen nicht gezogen werden kann. Die Färbungen der Blutzellen zeigen dennoch Parallelen zu den in der Leberphase erscheinenden Ringstrukturen.

Auf Grund der lytischen Fähigkeiten des pH-neutralen LLO hätte bereits eine LLO-Expression im Zytoplasma des Parasiten zur Zellyse führen müssen, was jedoch nicht zu beobachten war. Die fehlende Aktivität des LLO in der Parasitenzelle ist möglicherweise auf eine andere Konformation des Proteins zurückzuführen. So ist denkbar, dass dieses prokaryotische Protein in eukaryotischen Zellen anders gefaltet wird.

Listeriolysin wird in eukaryotischen Zellen über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut (Schnupf et al., 2007). Ein Schlüsselenzym dieses Abbauweges ist eine Aminoacyl-Transferase, die sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten existiert. *P. falciparum* besitzt eine Variante dieses Enzyms, die eher der prokaryotischen Form ähnelt (Graciet et al., 2006). Unter Umständen wird Listeriolysin, welches ebenfalls prokaryotischen Ursprungs ist, deshalb effizienter abgebaut. Das zügige Markieren des Listeriolysins mit Ubiquitin könnte die lytische Wirkung dieses Proteins

4. Diskussion

zunächst stören. Durch den anschließenden Abbau wäre LLO dann nicht mehr nachweisbar.

Den interessantesten Phänotyp bezüglich der LLO-Expression zeigten in diesem Zusammenhang die PbLSA4-LLO-Parasiten nach 48h. So wurden z.B. Plasmodien mit zerstörter PVM gefunden. Möglicherweise führt die LLO-Expression in einigen Fällen doch zum Absterben des Parasiten, was erklären könnte, warum in späten Stadien nur wenige PbLSA4-LLO-positive Parasiten gefunden wurden. Da stets auch intakte LLO-positive Parasiten detektiert werden konnten, hängt die Reaktion auf Listeriolysin möglicherweise davon ab, in welchem Ausmaß LLO exprimiert bzw. über den Proteasomweg abgebaut wird.

Das Listeriolysin sollte mit Hilfe des Exp1-Signalpeptids zur PV geleitet werden, wurde dort jedoch nicht detektiert. Ähnlich dem Konstrukt ohne Signalsequenz liegt es vielmehr gleichmäßig in der Parasitenzelle verteilt vor. Da die korrekte Sequenz des Konstrukts mittels Sequenzierung bestätigt wurde und gezeigt werden konnte, dass das Signalpeptid generell funktionsfähig ist, kann bezüglich der nicht erfolgten Sezernierung nur spekuliert werden. Möglicherweise wird der Transport zur PV dadurch verhindert, dass die dafür nötigen Transportvesikel bereits durch LLO zerstört werden. Dass bei derartiger LLO-Aktivität die Parasitenzelle lebensfähig bleibt, ist allerdings unwahrscheinlich.

Darüber hinaus käme eine veränderte Konformation des LLO als Ursache für den verhinderten Transport in Frage. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass das Protein gar nicht erst funktionsfähig exprimiert wurde. Eventuell registriert die Zelle die Expression dieses Fremdproteins und kann es dann z.B. durch Ubiquitin markieren (siehe oben). Ein so markiertes Protein tritt dann entsprechend nicht in den sekretorischen Transportweg der Zelle ein.

Abschließend ist festzustellen, dass keine signifikante Wirkung des Proteins Listeriolysin auf Parasit und Wirtszelle nachweisbar war. Neben zerstörten infizierten Zellen wurden immer auch intakte infizierte Zellen detektiert. Letztendlich ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Parasiten aus anderen Gründen als durch LLO-Einfluss abstarben.

Alternativ zu Listeriolysin könnte zukünftig Perfringolysin O eingesetzt werden, da dieses Poren-formende Protein natürlicherweise bei neutralem pH-Wert aktiv ist und über keine Degradationssequenzen verfügt. Bei *L. monocytogenes* konnte

4. Diskussion

Listeriolysin durch Perfringolysin O ersetzt und dadurch die Lyse der Wirtszelle herbeiführt werden (Hamon et al., 2006).

In zukünftigen Attenuierungsversuchen könnten darüber hinaus Proteine eingesetzt werden, die ihren Ursprung in Plasmodien selbst besitzen. So ist z.B. aus Sporozoiten eine Proteinfamilie mit einer so genannten *membrane-attack complex/perforin* (MACPF)-Domäne bekannt (Kaiser et al., 2004). Es wird vermutet, dass derartige Proteine von Sporozoiten sezerniert werden, um die Zellmembran von Hepatozyten zu lysieren und auf diese Weise in die Zelle zu gelangen. Würden diese Proteine unter der Kontrolle des *pblsa4*-Promotors untypisch zum Ende der Leberphase exprimiert, könnten sie eventuell die PVM und weitere Wirtszellmembranen zerstören. Wahrscheinlich wäre dazu keine Fusion mit spezifischen Signalpeptiden notwendig, da die Mitglieder der MACPF-Proteinfamilie selbst derartige Motive tragen.

4.7 Mögliche Attenuierung von *P. falciparum*-Parasiten

Ein direkter *BLAST-Search* gab keinen Hinweis auf eine Homologie des *pblsa4*-Gens bei *P. falciparum*. Es finden sich lediglich Übereinstimmungen mit Genen der anderen nagerpathogenen Plasmodien *P. chabaudi* und *P. yoelii*. Das Gen *pflsa1* wurde ebenfalls nicht über Homologiesuche gefunden, sondern durch Syntenie-Suche identifiziert (Kooij et al., 2005).

Um eine Syntenie-Suche für *pblsa4* durchzuführen, sind bezüglich des gesuchten Genlocus jedoch Informationen über dessen benachbarte Gene essentiell. Nur wenn in der direkten Umgebung konservierte Gene zu finden sind, die bei *P. falciparum* denselben Locus aufweisen, lässt sich auf das homologe Gen schließen. Die meisten der dem *pblsa4* benachbarten Gene kodieren jedoch lediglich für hypothetische Proteine, die nicht bei *P. falciparum* zu identifizieren waren. Dies erschwert die Syntenie-Suche, so dass auch mit Hilfe dieses Verfahrens bisher kein *pblsa4* entsprechendes Gen gefunden werden konnte.

Um mit Hilfe des *pblsa4*-Promotors den Malaria-Erreger durch Expression eines toxischen Proteins zu schwächen und daraus resultierend eine Lebendvakzine für

4. Diskussion

den Menschen zu erhalten, muss gewährleistet sein, dass der Promotor entweder auch bei *P. falciparum* identifiziert wird, oder aber der vorhandene *P. berghei*-Promotor ebenfalls bei dem humanpathogenen Erreger funktionsfähig ist. Artübergreifende Promotoraktivität konnte bereits am Beispiel funktionsfähiger *Pf*-Plasmide demonstriert werden, indem die Promotorregion des *P. chabaudi dhfr-ts*-Gens in *P. falciparum*-Plasmide erfolgreich eingefügt wurde (Crabb and Cowman, 1996). Da es sich sowohl bei *P. chabaudi* als auch bei *P. berghei* um nagetierspezifische Plasmodien handelt, besteht durchaus die Möglichkeit, dass der *pblsa4*-Promotor auch bei *P. falciparum* aktiv ist. Eine Attenuierung von *P. falciparum*-Parasiten durch die Expression toxischer Proteine unter der Kontrolle des *pblsa4*-Promotors wäre somit denkbar und sollte für weitere Impfstrategien in Betracht gezogen werden. Voraussetzung ist allerdings, dass die Evaluation der entsprechenden genetisch attenuierten Parasiten in *P. berghei* erfolgt ist.

Zusammenfassung

Über die Biologie des Leberstadiums von Plasmodien ist bisher wenig bekannt. Um mehr über diese Lebensphase des Parasiten zu erfahren, ist es vor allem wichtig Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren, die nur von Leberstadium-Parasiten exprimiert werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Regulation der Expression solcher Proteine interessant.

In der vorliegenden Arbeit ist es durch RT-PCR-Analysen gelungen, ein Gen von *P. berghei* zu identifizieren, das nur während der Leberphase exprimiert wird und deshalb *pblsa4* (*liver stage antigen 4*) genannt wurde. Aus Untersuchungen zum Zeitverlauf der *pblsa4*-Expression geht hervor, dass diese erst ca. 25h nach Infektion der Leberzelle einsetzt. Zur Kontrolle der Promotoraktivität wurde der vor dem *pblsa4*-Gen liegende 5' Bereich in ein für Plasmodien geeignetes Transfektionsplasmid vor das *gfp*-Gen kloniert. Damit konnte die Leberphasen-spezifische Aktivität des Promotorbereichs bestätigt und GFP nach 25h durch *in vivo*-Mikroskopie nachgewiesen werden.

Um das Leberphasen-spezifische Protein PbLSA4 durch polyklonale Antikörper lokalisieren zu können, wurde das dazugehörige Gen in bakterielle Expressionsplasmide kloniert, PbLSA4 rekombinant exprimiert, gereinigt und zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Mit dem α PbLSA4-Antiserum konnte gezeigt werden, dass sich das Protein im Bereich der parasitophoren Vakuole bzw. der Parasiten-Plasmamembran befindet. Darüber hinaus wurde das *pblsa4*-Gen in ein Transfektionsplasmid kloniert, um ein PbLSA4-GFP-Fusionsprotein zu erhalten. Der GFP-Nachweis durch Immunfluoreszenz-Analysen bestätigte dabei die durch das Antiserum gefundene Lokalisation des PbLSA4-Proteins.

Um mehr über die Funktion von PbLSA4 zu erfahren, wurde ein Teil des Gens deletiert. Die Parasiten zeigten jedoch keine Beeinträchtigung in ihrer Entwicklung. PbLSA4 ist also entweder für den Parasiten nicht essentiell, oder seine Funktion wurde durch die Teildeletion nicht ausreichend gestört bzw. das PbLSA4-Defizit durch andere Proteine kompensiert.

Darüber hinaus wurde das bakterielle Toxin Listeriolysin O (LLO) unter der Kontrolle des PbLSA4-Promotors in *P. berghei* exprimiert, um die Parasiten-Plasmamembran oder die parasitäre Vakuolenmembran zu schädigen und attenuierte Parasiten zu erzeugen. Dazu wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Eine zunächst zytosolische LLO-Expression sollte zur Perforation der Parasiten-Plasmamembran führen. Da

dies keine Beeinträchtigung des Parasiten zur Folge hatte, wurde durch die Expression eines PbLSA4-LLO-Fusionsproteins versucht, das Toxin in den Bereich der Parasiten-Plasmamembran zu leiten. Hier war zwar ein Effekt erkennbar, doch wurde der Parasit nicht ausreichend geschädigt.

Um daraufhin das aktive LLO direkt zur Cholesterol-haltigen parasitophoren Vakuolenmembran zu dirigieren, wurde es mit dem Signalpeptid eines bekannten Parasitenproteins fusioniert. Obwohl die zuvor erfolgte Fusion dieses Signalpeptids mit GFP tatsächlich zu einem Transport des GFPs in die parasitophore Vakuole führte, war derselbe Ansatz mit LLO nicht erfolgreich.

Durch die Versuche wurde gezeigt, dass LLO zwar exprimiert werden konnte, aber entweder nicht aktiv war oder nicht zu den Zielmembranen transportiert wurde. Daher müsste nach toxischen Proteinen gesucht werden, die tatsächlich zur Abtötung des Parasiten führen. Solche attenuierten Parasitenstämme könnten dann als effiziente Lebendvakzine eingesetzt werden. Im Falle der LLO-Expression in *P. berghei* war zwar keine ausreichend starke Attenuierung des Parasiten zu beobachten, jedoch können mit Hilfe des *pblsa4*-Promotorbereichs zukünftig weitere Toxine exprimiert werden, um den Parasiten zu attenuieren. Wenn diese Impfstrategie bei Mäusen erfolgreich getestet wurde, wäre ein ähnlicher Ansatz auch für humanpathogene Plasmodien denkbar.

Literaturliste

- Adisa, A., Rug, M., Klonis, N., Foley, M., Cowman, A.F. and Tilley, L. (2003) The signal sequence of exported protein-1 directs the green fluorescent protein to the parasitophorous vacuole of transfected malaria parasites. *J Biol Chem*, **278**, 6532-6542.
- Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., Solbach, W. and Laskay, T. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*, **169**, 898-905.
- Akarid, K., Arnoult, D., Micic-Polianski, J., Sif, J., Estaquier, J. and Ameisen, J.C. (2004) *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *J Leukoc Biol*, **76**, 95-103.
- Aly, A.S. and Matuschewski, K. (2005) A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med*, **202**, 225-230.
- Amino, R., Giovannini, D., Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J.F., Prevost, M.C., Ishino, T., Yuda, M. and Menard, R. (2008) Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe*, **3**, 88-96.
- Ansorge, I., Benting, J., Bhakdi, S. and Lingelbach, K. (1996) Protein sorting in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. *Biochem J*, **315 (Pt 1)**, 307-314.
- Azevedo, M.F. and del Portillo, H.A. (2007) Promoter regions of *Plasmodium vivax* are poorly or not recognized by *Plasmodium falciparum*. *Malar J*, **6**, 20.
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S.H., Schnieder, T. and Frevert, U. (2007) Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog*, **3**, e171.
- Bano, N., Romano, J.D., Jayabalasingham, B. and Coppens, I. (2007) Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. *Int J Parasitol*, **37**, 1329-1341.
- Basta, S. and Alatery, A. (2007) The cross-priming pathway: a portrait of an intricate immune system. *Scand J Immunol*, **65**, 311-319.
- Bavdek, A., Gekara, N.O., Priselac, D., Gutierrez Aguirre, I., Darji, A., Chakraborty, T., Macek, P., Lakey, J.H., Weiss, S. and Anderluh, G. (2007) Sterol and pH interdependence in the binding, oligomerization, and pore formation of Listeriolysin O. *Biochemistry*, **46**, 4425-4437.

Literaturliste

- Bruchhaus, I., Roeder, T., Rennenberg, A. and Heussler, V.T. (2007) Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol*, **23**, 376-383.
- Carrero, J.A., Calderon, B. and Unanue, E.R. (2004) Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J Immunol*, **172**, 4866-4874.
- Carrolo, M., Giordano, S., Cabrita-Santos, L., Corso, S., Vigarito, A.M., Silva, S., Leiriao, P., Carapau, D., Armas-Portela, R., Comoglio, P.M., Rodriguez, A. and Mota, M.M. (2003) Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat Med*, **9**, 1363-1369.
- Chen, X.M., Levine, S.A., Splinter, P.L., Tietz, P.S., Ganong, A.L., Jobin, C., Gores, G.J., Paya, C.V. and LaRusso, N.F. (2001) *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology*, **120**, 1774-1783.
- Clyde, D.F., McCarthy, V.C., Miller, R.M. and Hornick, R.B. (1973a) Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci*, **266**, 398-403.
- Clyde, D.F., Most, H., McCarthy, V.C. and Vanderberg, J.P. (1973b) Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci*, **266**, 169-177.
- Cox-Singh, J., Davis, T.M., Lee, K.S., Shamsul, S.S., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H.A., Conway, D.J. and Singh, B. (2008) *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*, **46**, 165-171.
- Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., Wickham, M.E., Brown, G.V., Coppel, R.L. and Cowman, A.F. (1997) Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell*, **89**, 287-296.
- Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (1996) Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7289-7294.
- de Koning-Ward, T.F., Janse, C.J. and Waters, A.P. (2000) The development of genetic tools for dissecting the biology of malaria parasites. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 157-185.
- Di Girolamo, F., Raggi, C., Bultrini, E., Lanfrancotti, A., Silvestrini, F., Sargiacomo, M., Birago, C., Pizzi, E., Alano, P. and Ponzi, M. (2005) Functional genomics, new tools in malaria research. *Ann Ist Super Sanita*, **41**, 469-477.
- Doolan, D.L. and Hoffman, S.L. (2000) The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. *J Immunol*, **165**, 1453-1462.

Literaturliste

- Edelson, B.T. and Unanue, E.R. (2001) Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity*, **14**, 503-512.
- Egan, J.E., Weber, J.L., Ballou, W.R., Hollingdale, M.R., Majarian, W.R., Gordon, D.M., Maloy, W.L., Hoffman, S.L., Wirtz, R.A., Schneider, I. and et al. (1987) Efficacy of murine malaria sporozoite vaccines: implications for human vaccine development. *Science*, **236**, 453-456.
- Everett, M.L., Collins, B.H. and Parker, W. (2003) Kupffer cells: another player in liver tolerance induction. *Liver Transpl*, **9**, 498-499.
- Franke-Fayard, B., Trueman, H., Ramesar, J., Mendoza, J., van der Keur, M., van der Linden, R., Sinden, R.E., Waters, A.P. and Janse, C.J. (2004) A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol*, **137**, 23-33.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M. and Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419**, 498-511.
- Glomski, I.J., Gedde, M.M., Tsang, A.W., Swanson, J.A. and Portnoy, D.A. (2002) The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol*, **156**, 1029-1038.
- Goebel, S., Luder, C.G., Lugert, R., Bohne, W. and Gross, U. (1998) *Toxoplasma gondii* inhibits the in vitro induced apoptosis of HL-60 cells. *Tokai J Exp Clin Med*, **23**, 351-356.
- Graciet, E., Hu, R.G., Piatkov, K., Rhee, J.H., Schwarz, E.M. and Varshavsky, A. (2006) Aminoacyl-transferases and the N-end rule pathway of prokaryotic/eukaryotic specificity in a human pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3078-3083.
- Greenwood, B.M., Fidock, D.A., Kyle, D.E., Kappe, S.H., Alonso, P.L., Collins, F.H. and Duffy, P.E. (2008) Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*, **118**, 1266-1276.
- Grode, L., Seiler, P., Baumann, S., Hess, J., Brinkmann, V., Nasser Eddine, A., Mann, P., Goosmann, C., Bandermann, S., Smith, D., Bancroft, G.J., Reyrat, J.M., van Soolingen, D., Raupach, B. and Kaufmann, S.H. (2005) Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest*, **115**, 2472-2479.

- Gunther, K., Tummler, M., Arnold, H.H., Ridley, R., Goman, M., Scaife, J.G. and Lingelbach, K. (1991) An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. *Mol Biochem Parasitol*, **46**, 149-157.
- Guzman, C.A., Domann, E., Rohde, M., Bruder, D., Darji, A., Weiss, S., Wehland, J., Chakraborty, T. and Timmis, K.N. (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, **20**, 119-126.
- Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P. (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*, **4**, 423-434
- Heussler, V.T., Machado, J., Jr., Fernandez, P.C., Botteron, C., Chen, C.G., Pearse, M.J. and Dobbelaere, D.A. (1999) The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7312-7317.
- Heussler, V.T., Rottenberg, S., Schwab, R., Kuenzi, P., Fernandez, P.C., McKellar, S., Shiels, B., Chen, Z.J., Orth, K., Wallach, D. and Dobbelaere, D.A. (2002) Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria*. *Science*, **298**, 1033-1036.
- Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C. and Haldar, K. (2004) A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*, **306**, 1934-1937.
- Hiss, J.A., Przyborski, J.M., Schwarte, F., Lingelbach, K. and Schneider, G. (2008) The *Plasmodium* export element revisited. *PLoS ONE*, **3**, e1560.
- Hoffman, S.L., Isenbarger, D., Long, G.W., Sedegah, M., Szarfman, A., Mellouk, S. and Ballou, W.R. (1990) T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes. *Bull World Health Organ*, **68 Suppl**, 132-137.
- Hollingdale, M.R., Leland, P. and Schwartz, A.L. (1983) In vitro cultivation of the exoerythrocytic stage of *Plasmodium berghei* in a hepatoma cell line. *Am J Trop Med Hyg*, **32**, 682-684.
- Huh, C.G., Factor, V.M., Sanchez, A., Uchida, K., Conner, E.A. and Thorgeirsson, S.S. (2004) Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4477-4482.
- Hunter, T. (1982) Synthetic peptide substrates for a tyrosine protein kinase. *J Biol Chem*, **257**, 4843-4848.
- Ishino, T., Chinzei, Y. and Yuda, M. (2005a) A *Plasmodium* sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cell Microbiol*, **7**, 199-208.

Literaturliste

- Ishino, T., Chinzei, Y. and Yuda, M. (2005b) Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol Microbiol*, **58**, 1264-1275.
- Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y. and Yuda, M. (2004) Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol*, **2**, E4.
- Jahiel, R.I., Vilcek, J. and Nussenzweig, R.S. (1970) Exogenous interferon protects mice against *Plasmodium berghei* malaria. *Nature*, **227**, 1350-1351.
- Janse, C.J. and Waters, A.P. (1995) *Plasmodium berghei*: the application of cultivation and purification techniques to molecular studies of malaria parasites. *Parasitol Today*, **11**, 138-143.
- Jobe, O., Lumsden, J., Mueller, A.K., Williams, J., Silva-Rivera, H., Kappe, S.H., Schwenk, R.J., Matuschewski, K. and Krzych, U. (2007) Genetically attenuated *Plasmodium berghei* liver stages induce sterile protracted protection that is mediated by major histocompatibility complex Class I-dependent interferon-gamma-producing CD8+ T cells. *J Infect Dis*, **196**, 599-607.
- Kaiser, K., Camargo, N., Coppens, I., Morrisey, J.M., Vaidya, A.B. and Kappe, S.H. (2004) A member of a conserved *Plasmodium* protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. *Mol Biochem Parasitol*, **133**, 15-26.
- Kooij, T.W., Carlton, J.M., Bidwell, S.L., Hall, N., Ramesar, J., Janse, C.J. and Waters, A.P. (2005) A *Plasmodium* whole-genome synteny map: indels and synteny breakpoints as foci for species-specific genes. *PLoS Pathog*, **1**, e44.
- Kuenzi, P., Schneider, P. and Dobbelaere, D.A.E. (2003) *Theileria parva*-Transformed T Cells Show Enhanced Resistance to Fas/Fas Ligand-Induced Apoptosis. *J. Immunol*, **171**, 1224-1231.
- Labaied, M., Camargo, N. and Kappe, S.H. (2007) Depletion of the *Plasmodium berghei* thrombospondin-related sporozoite protein reveals a role in host cell entry by sporozoites. *Mol Biochem Parasitol*, **153**, 158-166.
- Le Roch, K.G., Johnson, J.R., Florens, L., Zhou, Y., Santrosyan, A., Grainger, M., Yan, S.F., Williamson, K.C., Holder, A.A., Carucci, D.J., Yates, J.R., 3rd and Winzeler, E.A. (2004) Global analysis of transcript and protein levels across the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Genome Res*, **14**, 2308-2318.
- Leiriao, P., Albuquerque, S.S., Corso, S., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Rodriguez, A., Giordano, S. and Mota, M.M. (2005) HGF/MET signalling protects *Plasmodium*-infected host cells from apoptosis. *Cell Microbiol*, **7**, 603-609.

Literaturliste

- Marti, M., Baum, J., Rug, M., Tilley, L. and Cowman, A.F. (2005) Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. *J Cell Biol*, **171**, 587-592.
- Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E. and Cowman, A.F. (2004) Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, **306**, 1930-1933.
- Mazier, D., Goma, J., Pied, S., Renia, L., Nussler, A., Miltgen, F., Mattei, D. and Grau, G. (1990) Hepatic phase of malaria: a crucial role as "go-between" with other stages. *Bull World Health Organ*, **68 Suppl**, 126-131.
- McAndrew, M.B., Read, M., Sims, P.F. and Hyde, J.E. (1993) Characterisation of the gene encoding an unusually divergent TATA-binding protein (TBP) from the extremely A+T-rich human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Gene*, **124**, 165-171.
- Meis, J.F., Verhave, J.P., Meuwissen, J.H., Jap, P.H., Princen, H.M. and Yap, S.H. (1984) Fine structure of *Plasmodium berghei* exoerythrocytic forms in cultured primary rat hepatocytes. *Cell Biol Int Rep*, **8**, 755-765.
- Menard, R. (2008) Imaging the pre-erythrocytic phase of malaria. *International journal for Parasitology*, **38**, S17-S33.
- Militello, K.T., Dodge, M., Bethke, L. and Wirth, D.F. (2004) Identification of regulatory elements in the *Plasmodium falciparum* genome. *Mol Biochem Parasitol*, **134**, 75-88.
- Miller, S.K., Good, R.T., Drew, D.R., Delorenzi, M., Sanders, P.R., Hodder, A.N., Speed, T.P., Cowman, A.F., de Koning-Ward, T.F. and Crabb, B.S. (2002) A subset of *Plasmodium falciparum* SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. *J Biol Chem*, **277**, 47524-47532.
- Molestina, R.E., Payne, T.M., Coppens, I. and Sinai, A.P. (2003) Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Sci*, **116**, 4359-4371.
- Molestina, R.E. and Sinai, A.P. (2005) Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host IkappaBalpha. *Cell Microbiol*, **7**, 351-362.
- Mota, M.M., Hafalla, J.C. and Rodriguez, A. (2002) Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med*, **8**, 1318-1322.
- Mota, M.M. and Rodriguez, A. (2001) Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes Infect*, **3**, 1123-1128.
- Mueller, A.K., Camargo, N., Kaiser, K., Andorfer, C., Frevert, U., Matuschewski, K. and Kappe, S.H. (2005a) *Plasmodium* liver stage developmental arrest by

Literaturliste

- depletion of a protein at the parasite-host interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3022-3027.
- Mueller, A.K., Deckert, M., Heiss, K., Goetz, K., Matuschewski, K. and Schluter, D. (2007) Genetically attenuated *Plasmodium berghei* liver stages persist and elicit sterile protection primarily via CD8 T cells. *Am J Pathol*, **171**, 107-115.
- Mueller, A.K., Labaied, M., Kappe, S.H. and Matuschewski, K. (2005b) Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature*, **433**, 164-167.
- Murphy, S.C., Samuel, B.U., Harrison, T., Speicher, K.D., Speicher, D.W., Reid, M.E., Prohaska, R., Low, P.S., Tanner, M.J., Mohandas, N. and Haldar, K. (2004) Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood*, **103**, 1920-1928.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, **10**, 1-6.
- Nunes, A., Thathy, V., Bruderer, T., Sultan, A.A., Nussenzweig, R.S. and Menard, R. (1999) Subtle mutagenesis by ends-in recombination in malaria parasites. *Mol Cell Biol*, **19**, 2895-2902.
- Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H. and Orton, C. (1967) Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *plasmodium berghei*. *Nature*, **216**, 160-162.
- Oliveira-Ferreira, J. and Daniel-Ribeiro, C. (2001) Protective CD8+ T cell responses against the pre-erythrocytic stages of malaria parasites: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **96**, 221-227.
- Osta, M.A., Christophides, G.K. and Kafatos, F.C. (2004) Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science*, **303**, 2030-2032.
- Petersen, C.A., Krumholz, K.A., Carmen, J., Sinai, A.P. and Burleigh, B.A. (2006) *Trypanosoma cruzi* infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. *Infect Immun*, **74**, 1580-1587.
- Pradel, G. and Frevert, U. (2001) Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology*, **33**, 1154-1165.
- Racanelli, V. and Rehermann, B. (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology*, **43**, S54-62.
- Ragge, K., Arnold, H.H., Tummler, M., Knapp, B., Hundt, E. and Lingelbach, K. (1990) In vitro biosynthesis and membrane translocation of the serine rich protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **42**, 93-100.

Literaturliste

- Rug, M., Wickham, M.E., Foley, M., Cowman, A.F. and Tilley, L. (2004) Correct promoter control is needed for trafficking of the ring-infected erythrocyte surface antigen to the host cytosol in transfected malaria parasites. *Infect Immun*, **72**, 6095-6105.
- Sacci, J.B., Jr., Ribeiro, J.M., Huang, F., Alam, U., Russell, J.A., Blair, P.L., Witney, A., Carucci, D.J., Azad, A.F. and Aguiar, J.C. (2005) Transcriptional analysis of in vivo *Plasmodium yoelii* liver stage gene expression. *Mol Biochem Parasitol*, **142**, 177-183.
- Samuel, B.U., Mohandas, N., Harrison, T., McManus, H., Rosse, W., Reid, M. and Haldar, K. (2001) The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J Biol Chem*, **276**, 29319-29329.
- Schmidt-Christensen, A., Sturm, A., Horstmann, S. and Heussler, V.T. (2008) Expression and processing of *Plasmodium berghei* SERA3 during liver stages. *Cell Microbiol*.
- Schnupf, P., Portnoy, D.A., and Decatur, A.L. (2006) Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: role of the PEST-like sequence. *Cellular Microbiology*, **8**(2), 353-364.
- Schnupf, P. and Portnoy, D.A. (2007) Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes Infect*, **9**, 1176-1187.
- Schnupf, P., Zhou, J., Varshavsky, A. and Portnoy, D.A. (2007) Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* into the host cell cytosol is degraded by the N-end rule pathway. *Infect Immun*, **75**, 5135-5147.
- Schuerch, D.W., Wilson-Kubalek, E.M. and Tweten, R.K. (2005) Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12537-12542.
- Shatursky, O., Heuck, A.P., Shepard, L.A., Rossjohn, J., Parker, M.W., Johnson, A.E., Tweten, R.K. (1999) The Mechanism of Membrane Insertion for a Cholesterol-Dependent Cytolysin: A Novel Paradigm for Pore-Forming Toxins. *Cell*, **99**, 293-299.
- Singh, A.P., Buscaglia, C.A., Wang, Q., Levay, A., Nussenzweig, D.R., Walker, J.R., Winzeler, E.A., Fujii, H., Fontoura, B.M. and Nussenzweig, V. (2007) *Plasmodium* circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. *Cell*, **131**, 492-504.
- Spielmann, T., Hawthorne, P.L., Dixon, M.W., Hannemann, M., Klotz, K., Kemp, D.J., Klonis, N., Tilley, L., Trenholme, K.R. and Gardiner, D.L. (2006) A cluster of ring stage-specific genes linked to a locus implicated in cytoadherence in *Plasmodium falciparum* codes for PEXEL-negative and PEXEL-positive proteins exported into the host cell. *Mol Biol Cell*, **17**, 3613-3624.

Literaturliste

- Stoitzner, P., Tripp, C.H., Eberhart, A., Price, K.M., Jung, J.Y., Bursch, L., Ronchese, F. and Romani, N. (2006) Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7783-7788.
- Strid, J., Callard, R. and Strobel, S. (2006) Epicutaneous immunization converts subsequent and established antigen-specific T helper type 1 (Th1) to Th2-type responses. *Immunology*, **119**, 27-35.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.M., Menard, R. and Heussler, V.T. (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, **313**, 1287-1290.
- Sturm, A. and Heussler, V. (2007) Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic Plasmodium parasites. *Med Microbiol Immunol*, **196**, 127-133.
- Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S. and Menard, R. (1997) TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell*, **90**, 511-522.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. and Stahl, F.W. (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, **33**, 25-35.
- Tang, P., Rosenshine, I., Cossart, P. and Finlay, B.B. (1996) Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infect Immun*, **64**, 2359-2361.
- Tarun, A.S., Dumpit, R.F., Camargo, N., Labaied, M., Liu, P., Takagi, A., Wang, R. and Kappe, S.H. (2007) Protracted sterile protection with Plasmodium yoelii pre-erythrocytic genetically attenuated parasite malaria vaccines is independent of significant liver-stage persistence and is mediated by CD8+ T cells. *J Infect Dis*, **196**, 608-616.
- Tarun, A.S., Peng, X., Dumpit, R.F., Ogata, Y., Silva-Rivera, H., Camargo, N., Daly, T.M., Bergman, L.W. and Kappe, S.H. (2008) A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 305-310.
- Templeton, T.J. and Deitsch, K.W. (2005) Targeting malaria parasite proteins to the erythrocyte. *Trends Parasitol*, **21**, 399-402.
- Todryk, S.M. and Walther, M. (2005) Building better T-cell-inducing malaria vaccines. *Immunology*, **115**, 163-169.
- Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193**, 673-675.
- van de Sand, C., Horstmann, S., Schmidt, A., Sturm, A., Bolte, S., Krueger, A., Lutgehetmann, M., Pollok, J.M., Libert, C. and Heussler, V.T. (2005) The liver

- stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Mol Microbiol*, **58**, 731-742.
- van Dijk, M.R., Douradinha, B., Franke-Fayard, B., Heussler, V., van Dooren, M.W., van Schaijk, B., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Mota, M.M., Waters, A.P. and Janse, C.J. (2005) Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12194-12199.
- van Ooij, C., Tamez, P., Bhattacharjee, S., Luisa Hiller, N., Harrison, T., Liolios, K., Kooij, T., Ramesar, J., Balu, B., Adams, J., Waters, A., Janse, C., Haldar, K. (2008) The Malaria Secretome: From Algorithms to Essential Function in Blood Stage Infection. *PLoS Path*, **4**, 1-15.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 584-640.
- White, N.J. (2008) *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*, **46**, 172-173.
- Yaffe, M.B. and Elia, A.E. (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 131-138.
- Young, J.A., Johnson, J.R., Benner, C., Yan, S.F., Chen, K., Le Roch, K.G., Zhou, Y. and Winzeler, E.A. (2008) In silico discovery of transcription regulatory elements in *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*, **9**, 70.

Anhang**Promotorregion *pblsa4***

```

AGA GTT GCA TTA TCG TCA AAA GTG TAT AAA ATT ATA AAA TAG AGC
AAC ATA AAA TGG ATA ATA ATG GTG AAA CTA AAA ATA ATA AAA TTA
AAG TTG GGT AAA TAA AAA CAC AAC ATA AAG GAT CAA GGT ATT ATT
TTT TTA AAT TTT TTT TAT GAA AAA CTA TTA GAA CAA TTT AAA ATA
ATG CAT ATT ATG CTT TAT TTG TAC AAT ATA ATT AAA ATA AAA CGA
ATA ACG ATG TGA TTA TTC AAT ATG CAG ATT AAT AAT ATA TAC ACA
TGT AAA TGT ATA TAT ACT TCT TCA TTG TCA AAT TCC TTA GGC ATA
TGT AGC ATA TAT GGT TTT TGA CGG TTC TTT AAA AAT ATA CAA CTG
TAA TCC CTA ATA AAT GAA TGC AGT TGA AAT CGA ACA AAT CCA TAT
GCT TCC GTA TCG ATT TAA CCA TTT AGG TAG TGA TCT ATG ATC GAT
CTA CAT GTG AAG AAA ATT GGC ATC TTT TAA AAA CTC TTT CAT AAT
GGT TTA TGA GTT CTT TAG ATC ATA TAT TAT TTA AAC AAA AAA TAA
AAT AAA TCA CCT ATT TTT TTA TAT TCG ATA AAG CGT GCA AAC AAA
TTT GCA TGT ATG TAT TCT ATT ATC GTT GGT TTT TTT TAC ACC ACC
TTT TTT TTA TTT ATA ATG TTT TTC ACC ACA AAG CAA CTA TAT ATA
AAA AAC ACA CTA AAA ATA TAT AAT TAA ATT AAA AAA TAA TAA TAA
AGA AAA TAA AAA ATA AAA AAT AAA AAG CAT ATG TAT TAT ACA TGC
ATG TAT ATT CCC TGC ATA TGT ATG TTT TCA GTT CAG ATT AAG AAC
AAA AAA ATA CAG ATA ATT AAG CAT TTA TTT GTT ACG TTT ATA CAT
GTC AAT ACC AAA AAT ATA TAT GTG CCT ACA CAT GTT ACA TAT AAG
TAG ATA CAT ATA AAT ATA TCG GAG TAA TAT TCT TCT TCT TTC ATT
TTT CAC TTC TAT CAT AAT CAT TTT ACT TTT TAA ACA TAA AAA

```

Gen *pblsa4*

```

ATG AAA GAT CAT ATA AAA AAT GTA TGC TTT CGG AAA ACT CTA CTA
ATT TCA CTA CTG CTT ATT ATA TTA AAA TAC ACA AAA TAT GAT TAT
TTA GAA AAA GAA AAT GAT GAA AAA CAA AAA TAC AAC AGC AAT ATA
TCG TCA CCA AGT TTA CTA AGA ACA TAT TTT GAT GTA TAT GTC AAT
AGG AAA AAT ACG GAT GTA AAG ACA TTG AAG AAA TTG TTA AAA AAT
GTT ACG ATT TCT AAT AAT TAC CTT TGC ATG GTG AAA AAG GTA AAC
ATA AAT GTT TAC AAT AAA ATA TTT GGT AAT AAG ATG AGT AAA ATT
ATA TTG AGC AAC GAA AGA AAA TAT GGT AAA AAT GAT TTA AAA AAA
AAG TGC ATT ACT ACT GAA TCT TCA TCG TGC ACA TTT GGT GAA GAA
AAA AAA AGG AAA AAA TTA TTC ACA GAT TAT GAA AAA ATA AAT TTG
TAT AAA AAT AGT AAC CCC CTT GAG GAT ATT GAC GCA CAT GGA AAT
ACA ATT AAA GGT TTT CTT TTT GAA CTA TTT GAT ATA ATT GTA AAA
ATT AAG AAA ATT GTA ATA GAT GCA TCT AAC AAA ATG ATT TCC GTG
TGC CTA TTT AAT AAT GAT AAT TAC GAA GAA AAC TTA TTC TAC ATA
AAA AAT AAT AAG GAT TAT GAT GAA TTT CAT AAT TAT AAT TCT TAT
AAA TAT TAT GAA AAT CCA AAT ATA AAT ACA TAC AAC ATG AAT AAA
GAA TTG TAT GTA TAT AAT GAG GAA TAT GCT AAT AAA TAT TTA TAT
TCT TTT ATA GAC ATT TCA TCT GAT AAT TTA AAA TGT CGA TTT TAT
CAA AAA TCT GTT CAA GGA GAA GAT AGA AAT ATA GTT CCT GAT ATT
TTT AAG AAT AAA AAT GCG TAT AAT TTA TCT AAG GAT AAA AAG TAT
GAT AAC CAT AGT AAG ATG AAT GAT GGA AAT AAA TCG AAT TGT GGG
GTT TCA AGT GAC AAA ACC GAA AAA TAT ATA TTC GAC ACT GAA ACA
AAT AGA AAC ATA AAA CTT AAA AAG GAA CAA TTT TTG GAA ACA AAT
GCA AAA TGG AAT GAA AGC AAA ATA AAC CAA TCA AAC AAA CTG CAC
AAA AAA AAT GAC GAA GCA AAA TAT AGG TCG ATA GGA AGA ATT TTA
GCA GAA ACT CAA CAT GAA AAT TTA GTT TTA AGT ACA GAT TAA

```

Danksagung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Volker T. Heussler für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die intensive Betreuung meiner Arbeit. Er war stets interessiert und jederzeit offen für Fragen, Ideen und Diskussionen.

Des weiteren danke ich Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ich danke Herrn Dr. Simon Cutting von der Royal Holloway University of London für das α Listeriolysin-Mausserum sowie für die Plasmide, aus denen das *hlyA*-Gen kloniert wurde.

Für das Stipendium während der experimentellen Zeit danke ich dem Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. und besonders Frau Karin Lühmann.

Den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Malaria-I danke ich sehr für ihre Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und ihren Humor. Besonderen Dank möchte ich Ulrike Fröhlke aussprechen, da ich mit ihrer Hilfe bei der *PREP-Cell*-Technik ein sehr sauberes Protein erhalten habe.

Ich danke darüber hinaus Frau Dr. Christina Deschermeier für das Korrektur-Lesen.

Ich danke besonders meiner Frau Anna für die Hilfe und Unterstützung bei dieser Arbeit und meinem Sohn Jonas für die Ablenkung.